NAUNYN-SCHMIEDEBERGS

ARCHIV

FÜR

EXPERIMENTELLE PATHOLOGIE UND PHARMAKOLOGIE

UNTER MITWIRKUNG
DER DEUTSCHEN PHARMAKOLOGISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON

DR. L. HEILMEYER
PROFESSOR DER INNEREN MEDIZIN
FREIBURG i. Br.

DR. W. HEUBNER
EM. PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
HEIDELBERG

DR. P. HOLTZ
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
FRANKFURT

DR. L. LENDLE
PROFESSOR DER PHARMAKOLOGIE
GÖTTINGEN

228. BAND

MIT 145 TEXTABBILDUNGEN

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956

Alle Rechte vorbehalten.
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg.
Printed in Germany

Inhalt des 228. Bandes

Seite

Achelis, J. D., E. Haack und **K. Hardebeck,** Über neue blutzuckersenkende Substanzen 163

Albers, C., W. Brendel und **W. Usinger,** Die Regulierung des Blutdrucks in Barbitursäure- und Äthernarkose 125

—, s. **Usinger, W.**

Banerjee, R. P., und **H. F. Häusler,** Verteilungsverfahren löslicher Rauwolfia Alkaloide 172

Behmann, F. W., Die Regulierung der Wärmeproduktion bei Auskühlung homoiothermer Tiere 126

Berger, H., und **H. Höller,** Zur spasmolytischen Wirkung von Succus Liquiritiae 243

Bohné, G., s. **Greeff, K.,** und **E. Westermann**

Bornmann, G., Zur choleretischen Wirkung von Butylenglykol-Derivaten . . 203

—, Choleretische Wirkung neuerer 1,3-Butandiol-Derivate. Mit 2 Textabbildungen 367

Brendel, W., s. **Albers, C.,** und **W. Usinger**

Breuninger, H., Zur Differenzierung zentraler Sympathicolyse an der Ratte 195

Brunner, H., Die Beeinflussung der renalen Wasser- und Salzausscheidung normaler und hyposektomierter Ratten durch Nebennierenrindenhormone 155

—, **G. Kuschinsky** und **G. Peters,** Die Wirkung von Vasopressin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte bei Veränderungen der Salzkonzentration des Trinkwassers und nach Nierenparenchymresektionen. Mit 4 Textabbildungen 434

—, —, —, Der Einfluß von Oxytocin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte. Mit 2 Textabbildungen 457

—, —, —, Die Beeinflussung der renalen Wasser- und Salzausscheidung normaler und hypophysektomischer Ratten durch Nebennierenrindenhormone. Mit 1 Textabbildung 578

Brücke, F. v., Eröffnungsansprache zur 22. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Graz vom 4.—7. 9. 1955 1

Bubnoff, M. v., s. **Schmid, E.,** und **R. Taugner** . . . . . .

Busch, E., Über die Erregbarkeit des Rattenuterus im Cyclus 153

Chatterjee, A., M. L. Chatterjee und **H. F. Häusler,** Versuche zur biologischen Einstellung von Leberextrakten 243

Chatterjee, M. L., s. **Chaterjee, A.** und **H. F. Häusler**

Chatterjee, L. M., und **H. F. Häusler,** Über periphere „Anti"-Wirkungen von Rauwolfia serpentina Benth. (R. S.) 171

Cerletti, A., und **H. Konzett,** Spezifische Hemmung von 5-Oxytryptamin-Effekten durch Lysergsäurediäthylamid und ähnliche Körper 146

Clodi, P. H., s. **Kraupp, O., W. Kobinger** und **H. Stormann**

—, s. **Kobinger, W., O. Kraupp** und **H. Stormann**

Coper, H., Änderungen des ATP-Gehaltes im Gehirn nach Einwirkung verschiedener zentralerregender Pharmaka. Mit 3 Textabbildungen 143

Dasgupta, S. R., und **H. F. Häusler,** Beiträge zur Analyse der Chlorpromazin-Wirkungen 188

Davis, R. E., s. **Fleckenstein, A.,** und **J. Janke**

Seite

Duesberg, R., und **L. Friederici,** Der Einfluß von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Aminocapronsäure, T-Vitam in GOETSCH und WGH-SOLCO auf das Knochenmarkswachstum in vitro. Mit 9 Textabbildungen 347

Düker, H., Über die Wirkung sehr geringer Alkoholmengen auf die geistige Leistungsfähigkeit 175

Eickstedt, K.-W. v. Ein Beitrag zur Funktion gonadotroper Hormone . . . 157

Enders, A., Silberelimination nach experimenteller Argyrose 206

Fawaz, G., Die Wirkung von Fluoressigsäure auf Leistung und Stoffwechsel des Herzlungenpräparates des Hundes 377

Fialová, A., s. **Rašková, H.,** und **B. Rybová**

Fleckenstein, A., Die Biochemie der Muskelerregung. Mit 2 Textabbildungen 46

—, **J. Janke** und **R. E. Davis,** Der Austausch von radioaktivem Phosphat mit dem α-, -β und γ-Phosphor von ATP und mit Kreatinphosphat bei der Kontraktur des Froschrectus durch Acetylcholin, Nicotin und Succinylcholin. Mit 3 Textabbildungen 596

Flemming, K., Versuche über Strahlenhämolyse 224

Freund, G., s. **Schmid, E.,** und **H. Waltz**

Freund, H., s. **Schroeder, W.,** und **F. Gersmeyer**

Friebel, H., und **B. Lund,** Bakterien als Ursache allergischer Asthmaanfälle (Versuche mit Keimen aus der Klebsiella-Gruppe) 189

Friederici, L., s. **Duesberg, R.**

Gerlach, E., Einfluß von Stoffwechselgiften auf di Pəhosphorsäure-Ester und den $^{32}PO_4$-Turnover in Menschen- und Tauben-Erythrocyten 128

Gersmeyer, F., s. **Schroeder, W.,** und **H. Freund**

Ginzel, K. H., Die Wirkung von d-Lysergsäurediäthylamid (LSD) auf Kreislaufreflexe 149

Graf, K., s. **Kroneberg, G.,** und **W. Overbeck**

Greeff, K., E. Westermann und **G. Bohné,** Zur Pharmakologie und Toxikologie des Cholins. Mit 9 Textabbildungen 481

Göltner, E., R. Koch und **M. Schwab,** Der Einfluß von Digitalisglykosiden auf das Glomerulusfiltrat, die Wasser- und Elektrolytausscheidung der Niere und die Plasmaelektrolyte bei Herzinsuffizienz 251

Gottstein, U., H. Hille, A. Oberdorf und **H. Schaefer,** Über die Kreislaufwirkung von 4-Methyl-2-Aminopyridin. Mit 4 Textabbildungen 314

Haack, E., s. **Achelis, J. D.,** und **K. Hardebeck**

Habermann, E., und **W. P. Neumann,** Crotactin, ein neues pharmakologisches Wirkprinzip aus dem Gift von Crotalus terrificus 217

Häusler, H. F., s. **Banerjee, R. P.**

—, s. **Chatterjee, A.** und **M. L. Chatterjee**

—, s. **Chatterjee, L. M.**

—, s. **Dasgupta, S. R.**

Hagen, U., s. **Koch, R.**

Hamacher, J., Laufende, direkte Anzeige und Registrierung der Häufigkeit beliebiger Vorgänge. Mit 1 Textabbildung 245

Hardebeck, K., s. **Achelis, J. D.,** und **E. Haack**

Hartmann, F., H. Lenz, C. Lopez-Calleja und **H. Münzenberg,** Die Resorptionsweise von Aminosäuren aus dem Dünndarm. Mit 7 Textabbildungen 403

—, —, —, —, Über die Serumeiweißfraktionen des Pfortader- und Lebervenenblutes während der Resorption eines Aminosäuregemisches aus dem Darm. Mit 2 Textabbildungen 414

Seite

Henschler, D., Zur Identifizierung von Cholinestern in biologischem Material 201

Herz, A., Über die Wirkung von Flavonabkömmlingen auf die Membran von Pferdeerythrocyten 221

Hille, H., s. **Gottstein, U., A. Oberdorf** und **H. Schaefer**

Höller, H., und **A. Kiehtreiber,** Die Auswertung sympathicolytischer Stoffe an der isolierten Kaninchenmilz 150

—, s. **Berger, H.**

Holle, G., und **Chr. Müller,** Über Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration in der Meerschweinchenniere nach Arterienligatur. Mit 2 Textabbildungen 501

Holt, C. v., s. **Leppla, W.**

Holtz, P., K. Stock und **E. Westermann,** Über den Einfluß des Thyroxins und des Hungerns auf die Aktivität der Monoaminoxydase und Dopadecarboxylase der Leber. Mit 1 Textabbildung 322

Hotovy, R., Messung zentralanalgetischer Wirkungen mit der Régnierschen Methode. Mit 2 Textabbildungen 387

Hornykiewicz, O., und **W. Kobinger,** Über den Einfluß von Eserin, Tetraäthylpyrophosphat (TEPP) und Neostigmin auf den Blutdruck und die pressorischen Carotissinusreflexe der Ratte. Mit 4 Textabbildungen . . . 493

Huković, S., s. **Stern, P.,** und **A. Misirlija**

Jacobi, H., s. **Rummel, W.,** und **K. Pfleger**

Janke, J., s. **Fleckenstein, A.,** und **R. E. Davis**

de Jongh, D. K., Synthetische oxytocische Substanzen 106

Kaller, H., Die Erregbarkeit des Halsganglion der Ratte durch Pharmaka. Mit 3 Textabbildungen 361

—, Die Technik der intraarteriellen Infusion am oberen Halsganglion der Ratte 248

Kiehtreiber, A., s. **Höller, H.**

Kobinger, W., O. Kraupp, H. Stormann und **P. H. Clodi,** Einfluß des lokalen Wundstarrkrampfes auf die Kaliumfreisetzung aus der Skeletmuskulatur durch Acetylcholin. Mit 4 Textabbildungen 425

—, s. **Hornykiewicz, O.**

— s. **Kraupp, O., H. Stormann** und **H. P. Clodi.**

Koch, R., und **U. Hagen,** Zur Toxikologie der Monojodessigsäure und ihrer abgestuften Affinität zu Sulfhydrylkörpern. Mit 8 Textabbildungen . . . 227

—, s. **Göltner, E.,** und **M. Schwab**

Konzett, H., s. **Cerletti, A.**

Kopera, H., Wirkung einiger Kreislaufmittel und Analeptica auf Blutdruck und Atmung nach Chlorpromazin 189

Koransky, W., Fraktionierte Darstellung von Nucleotiden aus dem Gehirn von Ratten im Ruhezustand und im Krampfanfall. Mit 1 Textabbildung. 140

Kramer, M., Untersuchungen über die Pathogenese anaphylactoider Ödeme der Ratte 233

—, Pharmakologische Differenzierung des Eiklar- und Dextranödems der Ratte. Mit 3 Textabbildungen. 302

—, Die Bedeutung der Histaminfreisetzung durch Compound 48/80, Dextran und Eiereiweiß für die Ödementstehung bei der Ratte. Mit 3 Textabbildungen 340

—, Chemische Struktur und pharmakologische Wirkung atemhemmender Substanzen. 421

Seite

Kraupp, O., W. Kobinger, H. Stormann und **H. P. Clodi,** Kaliumfreisetzung sowie Natrium- und Chlorionenverschiebungen aus der Skeletmuskulatur durch Acetylcholin bei Durchströmung mit natriumarmer Blut-Tyrode-Verdünnung 131

—, Elektrolytverschiebungen in der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur durch Acetylcholin bei Durchströmung mit natriumchloridarmer Blut-Tyrode-Lösung. Mit 3 Textabbildungen 271

—, s. **Kobinger, W., H. Stormann** und **P. H. Clodi**

—, s. **Stumpf, Ch.**

Krause, D., Antagonismus von Parasympathicolytica gegenüber der elektrischen Vagusreizung am Hundedarm 194

Kreppel, E., und **H. F. Zipf,** Untersuchungen zur Dämpfung und Ausschaltung der Lungensensibilität 192

Kroneberg, G., K. Graf und **W. Overbeck,** Kombinationswirkungen der Rauwolfia-Alkaloide Reserpin und Raubasin 169

Kühn, G., Beitrag zur Pharmakologie des N-Methylpyridins 183

Kühnau, J., Arzneimittelwirkungen und intermediärer Stoffwechsel 81

Kunz, W., Über die Membranwirkung von Steroiden 157

Kuschinsky, G., s. **Brunner, H.,** und **G. Peters**

Kuschke, H. J., und **E. Pass,** Beitrag zur Wertbestimmung der gefäßerweiternden Wirkung des Khellin, vergleichende Untersuchung mit Papaverin 215

Langemann, H., Bestimmungen von Fermentaktivitäten in Geweben eines Falls von metastasierendem Karzinoid 244

Lembeck, F., und **R. Strobach,** Kaliumabgabe aus glatter Muskulatur 130

Lenz, H., s. **Hartmann, F., C. Lopez-Calleja** und **H. Münzenberg**

Leppla, W., und **C. v. Holt,** Blutzuckersenkende Peptide aus Blighia sapida . 166

Leuschner, F., Nachweis und Bestimmung mehrerer Coenzym-A-Verbindungen in der Leber von Meerschweinchen. Mit 3 Textabbildungen 288

Lienert, G. A., Pharmakopsychologische Untersuchungen über die Wirkungsunterschiede einiger Schlafmittel. Mit 3 Textabbildungen 176

Lochner, W., s. **Mercker, H.,** und **E. Schürmeyer**

Lopez-Calleja, C., s. **Hartmann, F., H. Lenz** und **H. Münzenberg**

Lüllmann, H., Über die Brauchbarkeit des Herz-Lungenpräparates der Ratte zur Prüfung der Herzwirksamkeit von Substanzen 216

Lund, B., s. **Friebel, H.**

Madjerek, Ž., und **P. Stern,** Einfluß von Chlorpromazin auf den Brechmechanismus der Tauben 187

Malorny, G., Mineralverschiebungen und Gewebsgasänderungen bei verschiedenen Kollapszuständen und ihre Beeinflußbarkeit durch Antihistaminica 136

Markwardt, F., Untersuchungen über Hirudin. Mit 1 Textabbildung 220

Matthies, Hj., Über Struktur- und Stoffwechselwirkungen von Formaldehyd] 241

Meier, R., s. **Schuler, W.**

Merck, H. L., Über Glykosidbestand und Resorption von „Gitalin" 217

Mercker, H., W. Lochner und **E. Schürmeyer,** Die Wirkung vasoaktiver Pharmaka auf die Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes 213

Michel, D., Mechanische Systole und elektrische Erregungsdauer unter Amylnitrit. Mit 3 Textabbildungen 547

Seite

Milković, S., und **Z. Supek,** Über die Wirkung von 5-Oxytryptamin (Serotonin) und Lysergsäurediäthylamid (LSD) auf das Hypophysen-Nebennierenrinde-System 146

Misirlija, A., s. **Stern, P.,** und **S. Huković**

Müller, Chr., s. **Holle, G.**

Münzenberg, H., s. **Hartmann, F., H. Lenz** und **C. Lopez-Calleja**

Muscholl, E., Das intracellulär gemessene Membranpotential des Rattenzwerchfells unter der Einwirkung thiolopriver Substanzen 160

Naumann, H., s. **Stenger, E. G.**

Neumann, W. P., s. **Habermann, E.**

Oberdorf, A., Wirkung verschiedener Analeptica auf das Hirnstrombild bei Schlafmittelvergiftung 182

—, s. **Gottstein, U., H. Hille** und **H. Schaefer**

Oettel, H., und **G. Wilhelm-Kollmannsperger,** Zur Frage der antiphlogistischen Wirkung von Azulenen. II. Mit 1 Textabbildung 331

Overbeck, W., s. **Kroneberg, G.,** und **K. Graf**

Pass, E., s. **Kuschke, H. J.**

Pedersen, J. G. A., s. **Schilling, M.**

Peters, G., Die Wirkung von Hypophysen-Hinterlappenhormonen auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte 154

—, s. **Brunner, H.,** und **G. Kuschinsky**

Pfleger, K., Umwandlung von Aminen 211

—, s. **Rummel, W.,** und **H. Jacobi**

Podvalová, I., s. **Votava, Z.**

Pulver, R., Die Potenzierung der narkotischen Wirkung von Barbitursäuren durch Derivate von Aryl-cycloalkyl-carbonsäuren. Mit 2 Textabbildungen 172

Quadbeck, G., Die Auswertung anticonvulsiver Verbindungen am audiogenen Krampf der Ratte. Mit 3 Textabbildungen 178

Rašková, H., O. Fialová und **B. Rybová,** Zur Pharmakodynamik von ATP . . 145

Raudonat, H. W., Papierchromatographische Auftrennung von Schlangengiften 219

Reiter, M., Wirkung kontraktionsverbessernder Maßnahmen auf den Alkaligehalt des isolierten Herzmuskels 133

Repke, K., Lichtwirkungen auf wasserstoffübertragende Fermente der Haut. 227

Röttger, H., Die Beeinflußbarkeit der unter einer Balneotherapie ablaufenden humoralen Regelvorgänge bei Rheumatikern. Mit 4 Textabbildungen. . 237

Rothlin, E., s. **Taeschler, M.**

Rummel, W., H. Jacobi und **K. Pfleger,** Enterale Resorption kleinster Eisenmengen 204

Rybová, B., s. **Rašková, H.,** und **A. Fialová**

Satke-Eichler, I., und **Chr. Stumpf,** Verzögerte Krampfwirkung hoher Insulindosen bei normalen und adrenalektomierten Mäusen. Mit 1 Textabbildung 161

Schaefer, H., s. **Gottstein, U., H. Hille** und **A. Oberdorf**

Schaefer, K.-P., Die corticalen Hüpf- und Aufsetzreflexe nach Rademaker als Test für pharmakologische Großhirnwirkungen. Mit 1 Textabbildung. . 556

Schaumann, W., Zum Angriffspunkt der Wirkung von Morphium auf den Meerschweinchendünndarm 168

Schilling, M., und **J. G. A. Pedersen,** Curarewirkung quaternärer bis-Alkylammonium-Alkyl-Dicarbonsäure-Ester-Salze 371

Seite

Schmid, E., M. v. Bubnoff und **R. Taugner,** Zur Nierenausscheidung von organischem und anorganischem Phosphat beim Hund 207

—, **H. Waltz** und **G. Freund,** Zur Kreislauf- und Atmungswirkung von Serotonin (5-Hydroxytryptamin) am wachen Hund. Mit 3 Textabbildungen 307

Schmid, W., Über die Bedeutung von intermediären Carbonsäuren für die Zellvermehrung der Hefe 241

Schneider, C., Kreisprozeß der Hämiglobinbildung durch aromatische Nitroverbindungen mit isolierten Fermenten 222

Schoetensack, W., Der Einfluß einiger Analgeticis auf die Ödemausbildung an der Rattenpfote im Vergleich zu ihrer Konzentration im Blut 237

Schrappe, O., s. **Wende, S.**

Schroeder, W., F. Gersmeyer und **H. Freund,** Die Bedeutung der Capillardruckmessung für die Beurteilung der Wirkung sogenannter capillarabdichtender Substanzen. Mit 3 Textabbildungen 566

—, Ein neues Dauerinfusionsgerät für tierexperimentellen und klinischen Gebrauch. Mit 1 Textabbildung 576

Schürmeyer, E., s. **Mercker, H.,** und **W. Lochner**

Schuler, W., und **R. Meier,** Wirkung von Sexualhormonen auf die Cortisonkatalysierte Linolsäureoxydation in vitro. Mit 3 Textabbildungen. . . . 474

Schwab, M., s. **Göltner, E.,** und **R. Koch**

Siess, M., Über das Verhältnis des Energieumsatzes zum Energieverbrauch bei der Muskelkontraktion (nach Versuchen an Warmblüterzwerchfellen) 139

Stämpfli, R., Die Ionentheorie des Erregungsvorgangs und ihre möglichen Zusammenhänge mit der Biochemie. Mit 9 Textabbildungen 29

Steinke, H.-J., s. **Vogel, G.**

Stenger, E. G., und **H. Naumann,** Beitrag zum antiphlogistischen Wirkungsmechanismus des Chinins. 240

Stern, P., S. Hukovič und **A. Misirlija,** Über die Ausscheidung des Adrenalin und Nor-Adrenalin bei Dystrophia musculorum progressiva 209

—, s. **Madjerek, Z.**

Stock, K., s. **Holtz, P.,** und **E. Westermann**

Stormann, H., s. **Kraupp, O., W. Kobinger** und **P. H. Clodi**

—, s. **Kobinger, W., O. Kraupp** und **P. H. Clodi**

Strobach, R., s. **Lembeck, F.**

Stumpf, Ch., und **O. Kraupp,** Über die Natur der neuromuskulären Lähmung von Hexamethylen-bis-carbaminoylcholin 202

—, s. **Satke-Eichler, J.**

Supek, Z., s. **Milković, S.**

Taeschler, M., und **E. Rothlin,** Zur Charakterisierung der zentralen Wirkung von Phenothiazinderivaten 184

Taugner, R., s. **Schmid, E.,** und **M. v. Bubnoff**

Trendelenburg, U., Der sekundäre Blutdruckanstieg nach Histamin und Pilocarpin 198

Tuppy, H., Natürliche oxytocische Substanzen 94

Usinger, W., und **C. Albers,** Die Regulierung der Atmung beim Wärmehecheln 124

—, s. **Albers, C.,** und **W. Brendel**

Veigel, H., Zur pharmakologischen Beeinflussung verschiedener Entzündungsformen 235

Seite

Vogel, G., und **H.-J. Steinke,** Untersuchungen zur Frage des Wirkungsmechanismus und eines gegenseitigen Antagonismus verschiedener Muskelrelaxantien. Mit 3 Textabbildungen 539

Vogt, W., Untersuchungen zur Natur von H-Substanzen 200

Votava, Z., und **I. Podvalová,** Über die pharmakologische Untersuchung synthetischer Wehenmittel. Substituierte N-Benzylpiperidine und 3,4-Dimethoxybenzylamine 150

—, Biologische Bestimmung von wasserlöslichen Mutterkornalkaloiden auf Grund der mydriatischen Wirkung an Mäusen 152

Wagner, R., Das Regelproblem in der Biologie. Mit 4 Textabbildungen . . . 6

Wahler, B., s. **Wollenberger, A.**

Waltz, H., s. **Schmid, E.,** und **G. Freund**

Wende, S., und **O. Schrappe,** Pharmakologische Alkaloidsucht-Diagnostik mit Hilfe eines Opiatantagonisten 168

Westermann, E., Über den Einfluß von Thyroxin und Trijodthyronin auf die Aminoxydase- und Dopadecarboxylaseaktivität der Leber. 159

—, s. **Greeff, K.,** und **G. Bohné**

—, s. **Holtz, P.,** und **K. Stock**

Wiegershausen, B., Neue Befunde bei der Hämolyse mit Hexadecylsulfonat. Mit 2 Textabbildungen 225

Wilhelm-Kollmannsperger, G., s. **Oettel, H.**

Wohnlich, H., Photometrie von Zucker-Farbreaktionen auf Papier. Mit 4 Textabbildungen 248

Wolff, Berichtigung zur Diskussion in Arch. Exper. Path. **228**, 93 (1956). . 614

Wollenberger, A., und **B. Wahler,** Einfluß von Protoveratrin und Strophanthin auf den Kationen- und Phosphatgehalt von Gehirnrindegewebe . . 134

Woolley, D. W., Arzneimittel und Antimetaboliten. Mit 4 Textabbildungen . 68

Zetler, G., Substanz P, ein Polypeptid aus Darm und Gehirn mit depressiven, hyperalgetischen und Morphin-antagonistischen Wirkungen auf das Zentralnervensystem. Mit 4 Textabbildungen 513

Zipf, H. F., s. **Kreppel, E.**

Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH

A. Eröffnungsansprache zur 22. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft

in Graz vom 4.—7. September 1955

F. v. Brücke (Wien): Es ist für mich eine besondere Freude, Sie alle in diesem Jahr hier in Graz begrüßen zu können, da es ja seit dem Ende des zweiten Weltkrieges das erste Mal ist, daß die Deutsche Physiologische Gesellschaft und die Deutsche Pharmakologische Gesellschaft, deren Mitglieder seit der Gründung auch die österreichischen Pharmakologen und Physiologen immer gewesen sind, bei uns in der südöstlichsten Universitätsstadt des deutschen Sprachgebietes gemeinsam tagen können.

Man muß es einen besonders glücklichen Umstand nennen, daß dieses Ereignis sowohl für die westdeutsche Bundesrepublik, als auch für mein Heimatland in das Jahr fällt, in welchem beide Staaten ihre Eigenstaatlichkeit in vollem Umfang wieder erreicht haben.

Für uns als Vertreter der Wissenschaft haben diese weltpolitischen Ereignisse vor allem die Bedeutung, daß in unseren beiden Ländern weder die Forschung noch die Forscher in irgendeiner Weise mehr durch die Politik bedroht sind: Sie sind in diesem Sinne frei. Wir wollen dabei allerdings keineswegs jener Kollegen vergessen, für die das gleiche noch nicht gesagt werden kann.

Dieses Gefühl der Erleichterung und der Freiheit sollte uns jedoch vielleicht Veranlassung dazu geben, mehr als sonst über die grundsätzlichen Voraussetzungen und Bedingungen nachzudenken, die erfüllt sein müssen, damit die theoretische Wissenschaft ihre volle Wirkung entfalten und ihre volle Blüte erreichen kann.

Ich meine damit nicht jene zahlreichen Probleme, wie sie z. B. in den letzten Jahren besonders in der westlichen Welt vielfach erörtert werden, die sich etwa auf die Nachrichtenübermittlung, auf die Berichterstattung, die einheitliche Sprache der Wissenschaft, die Fragen der zunehmenden Spezialisierung, die Organisation von nationalen und internationalen Kongressen usw. beziehen, und die alle mehr oder weniger mit der außerordentlichen Zunahme von wissenschaftlich tätigen Menschen und ihrer Produktivität zusammenhängen. Ich meine vielmehr die Vorbedingungen, die in der Person des Forschers selbst und in seiner Haltung zur Wissenschaft und ihren zahlreichen Vertretern gegeben sein müssen, um eine günstige Entwicklung zu gewährleisten.

Man könnte versucht sein, diese Darstellung deduktiv zu gestalten, indem man die einzelnen Bedingungen, die erfüllt sein müssen, von allgemeinen, dogmatisch aufgestellten Postulaten ableitet. Sie werden es mir als Naturwissenschafter verzeihen, wenn ich es unternehme, an Hand einer kurzen biographischen Beschreibung zweier hervorragender Vertreter der theoretischen Medizin aus der Geschichte der Grazer Fakultät, von den Einzeltatsachen zum Allgemeinen fortzuschreiten.

Die erste dieser Persönlichkeiten ist Alexander Rollet, der von der Gründung dieser Fakultät im Jahre 1863 an bis zu seinem Tod 1903 eines der tätigsten und einflußreichsten Mitglieder der hiesigen Fakultät gewesen ist. Er entstammte einer seit Jahrhunderten in Baden bei Wien ansässigen, ursprünglich aus Savoyen eingewanderten, sehr angesehenen Ärztefamilie. Als einer der ersten österreichischen Assistenten Ernst Brückes in Wien und gleichzeitig als Schüler des damals ebenfalls in Wien an der militärärztlichen Akademie tätigen, berühmten Physiologen

Carl Ludwig, ist Rollet ein Vertreter der Physiologenschule gewesen, die von Johannes Müller ausgehend, den tiefsten Einfluß auf die Entwicklung dieses Faches in der ganzen Welt gehabt hat. Bei seiner Berufung nach Graz schrieb Ludwig: „Der Mann, welcher unter allen jüngeren Physiologen nicht nur Österreichs, sondern der gesamten gebildeten Welt zu den bedeutendsten und vielversprechendsten gehört, heißt Dr. Rollet. Ich sage nicht zu viel, wenn ich behaupte, daß seit Rokitanskys Auftreten in Österreich, kein talentvollerer und ernsterer Mensch in den medizinischen Fächern hervorgetreten ist." Wirklich ein glänzendes Lob aus so berufenem Munde. Ebenso bezeichnend ist es, daß Rollet 1871 von Helmholtz selbst als Nachfolger für die Lehrkanzel der Physiologie in Heidelberg genannt wurde, die dann sein Freund und alter Studiengenosse Kühne einnahm.

Dieser bedeutende Gelehrte kann als einer der Begründer der modernen Histochemie bezeichnet werden: Er erwies als Erster die selbständige Natur der Bindegewebsfibrillen und beschäftigte sich mit der Chemie der Kittsubstanz. Er hinterließ ein monumentales Werk über die Morphologie und Funktion der quergestreiften Muskelfasern, wobei er mit erstaunlicher Arbeitskraft hunderte von Species von den Insekten bis zu den Säugetieren untersuchte, ein Werk, das niemand unberücksichtigt lassen sollte, der sich ernsthaft mit Muskelphysiologie beschäftigt. Unabhängig und gleichzeitig mit Heidenhain entdeckte er die Belegzellen des Magenfundus (adelomorphe Zellen) und ihre Funktion bei der Magensalzsäurebildung.

Es war Rollet möglich, unter den bescheidensten äußeren Umständen hier in Graz eine berühmte Schule zu gründen: Besonders russische Gelehrte und Studenten fanden sich in so großer Zahl ein, daß damals ein eigener russischer Klub in Graz existierte, der eine russische Bibliothek hielt, welche heute noch teilweise an der neu gegründeten Universität in Laibach (Jugoslavien) aufbewahrt wird. Zu den Freunden Rollets gehörte Setchenow, der hier in Graz seine berühmte Untersuchungsreihe über Reflexhemmungszentren für Rückenmarksreflexe begann, die heute durch die Entdeckung oder Wiederentdeckung des „zentrencephalen Systemes" durch Magoun und andere eine so bedeutende Rolle spielen. Der später in Rußland einflußreiche Physiologe Boldyrew war ebenso Rollets Schüler, wie der Ophthalmologe Iwanov, mit welchem er über die Verhältnisse der Irisanheftung arbeitete, ferner Dobroslawin, der über Darmsaft, und Rynek, der über die Blutstase in entzündeten Geweben arbeitete.

Vor allem hat jedoch Rollet einen außerordentlichen Einfluß auf die Entwicklung seiner eigenen Fakultät genommen. Sein Assistent, der spätere Nobelpreisträger Pregl, hat die für die ganze Welt bahnbrechende organische Mikrochemie geschaffen. Sein zweiter Schüler Viktor v. Ebner war selbst ein Klassiker der Histologie und hat die noch heute tätige österreichische Histologenschule begründet. Ebenso wie in Wien die pathologische Physiologie unter dem Namen der experimentellen Pathologie sich als selbständiges Lehrfach von der Physiologie abtrennte, geschah dies hier in Graz durch den Rollet-Schüler Klemensiewicz. Endlich ist noch Rollets Schüler Zoth zu nennen, der ihm auf dem Lehrstuhl für Physiologie folgte.

Rollet war ein Mann von größtem Organisationstalent: Er fühlte sich in jungen Jahren zur Politik hingezogen, war Stadtverordneter von Graz, viermal Rektor der hiesigen Universität, er war in zahlreichen Organisationskomitees tätig, so z. B. für die österreichische Nordpolexpedition, die unter Peyer und Weiprecht das Franz-Josephsland entdeckte.

Die zweite Persönlichkeit, von der hier gesprochen werden soll und die fast genau fünfzig Jahre nach dem Auftreten Rollets die theoretische Medizin in Graz zu höchstem Ruhm führte, war der heute noch in höchstem Alter, aber bei voller

geistiger Frische in New York lebende Ehrendoktor der hiesigen Universität: Otto Loewi. Er entstammte einer jüdischen Frankfurter Kaufmannsfamilie und wollte sich nach dem Medizinstudium zunächst der inneren Medizin zuwenden. Anläßlich einer Pneumonie-Epidemie mit zahlreichen Todesfällen an seiner Station wurde er jedoch durch die Machtlosigkeit der damaligen Therapie so deprimiert, daß er sich der theoretischen Medizin zuerst unter O. Schmiedeberg und dann in Marburg unter H. H. Meyer zuwendete. Schon dort kam er mit zahlreichen englischen und amerikanischen Gelehrten zusammen, wie T. M. Fletcher und V. Henderson, und machte auch selbst eine Studienreise nach England, auf welcher er freundschaftliche Beziehungen zu englischen Pharmakologen anknüpfte, die durch sein ganzes Leben anhielten. 1905 nahm Meyer den jungen Gelehrten, der sich bereits durch Arbeiten über die Aufrechterhaltung des Stickstoffgleichgewichtes mit abgebautem Eiweiß, sowie durch Untersuchungen über die Nierenfunktion einen Namen gemacht hatte, nach Wien mit.

In Wien folgt nun eine Reihe von Arbeiten über Pharmaka, welche das vegetative Nervensystem beeinflussen, unter denen vor allem die letzte Veröffentlichung dieser Periode über die Wirkungssteigerung des Adrenalins durch Cocain (mit A. Fröhlich) bekannt geworden ist. 1911 erfolgt auf dringende Empfehlung von H. H. Meyer und nicht ohne Widerstände seine Berufung nach Graz. Es ist ein amüsantes Streiflicht auf die Kulturgeschichte jener Zeit, daß eine wohlmeinende Behörde, dem so wenig formellen Gelehrten den etwas steifen Titel eines Hofrates verlieh, um ihn — übrigens wohl nicht ganz ohne Erfolg — fester in seinem neuen Wirkungskreis zu verankern.

Ein Jahr später erscheinen aus Graz Arbeiten von Loewi, die im Licht der späteren Entwicklung bedeutungsvoll sind, da sie sich mit der Ähnlichkeit zwischen künstlicher Vagusreizung und der Wirkung von Muscarin und Pilocarpin beschäftigen. Wäre damals schon der Gedanke auf Acetylcholin gerichtet gewesen, so hätte vielleicht die berühmte Entdeckung der chemischen Übertragung der Nervenwirkung um 10 Jahre früher erfolgen können. Statt dessen folgt eine jetzt noch, oder gerade jetzt wieder, aktuelle Versuchsserie über Ionenwirkungen am Froschherz und erst 1921 die später mit dem Nobelpreis gekrönte fundamentale Reihe von Arbeiten, auf welche ich nicht eingehe, da sie allgemein bekannt sind. Ebensowenig möchte ich die beschämenden Ereignisse berühren, die schließlich Loewi zwangen nach so langen erfolgreichen Jahren seine zweite Heimat zu verlassen. Ich kann das um so eher vermeiden, als Loewi selbst längst einen Strich unter das alles gezogen hat.

Ebenso wie Rollet hat Loewi einen tiefen Einfluß auf die theoretische Medizin Österreichs gehabt: Nicht nur sind alle derzeit hier tätigen Ordinarien der Pharmakologie zu einer Zeit seine direkten Schüler gewesen, sondern angefangen mit seinem ersten Grazer Mitarbeiter Prof. Gaisböck in Innsbruck, zahlreiche an führender Stelle stehende Kliniker. Von Theoretikern möchte ich nur den Nobelpreisträger Cori nennen, der kurze Zeit bei ihm in Graz tätig war. Loewis Einfluß auf die Physiologie und Pharmakologie der Welt ist besonders infolge der genialen Fortentwicklung seiner Ideen durch die Dalesche Schule mehr in den westlichen Ländern entfaltet worden, aber auch er hat Schüler von überall angezogen.

Im ganzen kann man sich kaum zwei verschiedenere Gelehrtentypen vorstellen als Rollet und Loewi. Schon ihre Herkunft und Einstellung zur Umwelt unterscheidet sie scharf: Rollet war ein Organisationsgenie, der öffentliche und politische Wirkung suchte, Loewi war an diesen Dingen ganz uninteressiert. Rollet war ein systematischer, kein Detail auslassender, methodisch höchst interessierter Forscher; Loewis Schaffen war, wie er selbst bezeugt hat, mehr intuitiv und ganz auf das Wesentliche eines Problemes ausgerichtet, wobei er in späteren Jahren die einfachste Methodik bevorzugte und vor allem wenig Interesse an rein morpho-

logischen Studien hatte. Rollet war im Laboratorium schweigsam und gab selten direkte Anregungen; Loewi war von sprühender Lebendigkeit und Ideenfülle. Rollet scheint an Kunstwerken wenig Interesse gehabt zu haben; Loewi war ein feiner und begeisterungsfähiger Freund aller echten Kunst. Rollets Einfluß war im Osten, Loewis im Westen am stärksten und man könnte diese Liste noch beliebig fortsetzen. Bei dieser Sachlage wird es Sie vielleicht wundern, daß ich trotzdem gemeinsame Züge hervorheben und diese sogar als das für die theoretische Wissenschaft Wesentliche ansehen möchte. Dennoch ist es so!

Zunächst einmal sind beide Forscher, die hier in Graz so erfolgreich gewesen sind, Exponenten großer Schulen gewesen, der Johannes Müllerschen und der Schmiedebergschen, und sie waren sich stets mit Stolz dieser Tradition als einer Verpflichtung bewußt. Sie nahmen daher, obwohl selbst von größter Originalität und selbst Gründer neuer Schulen, ihrem Fach gegenüber eine historische Einstellung ein.

Sie kannten und verfolgten den Zug der Entwicklung und die daran maßgeblich beteiligten Persönlichkeiten in aller Welt. Mit erstaunlichem Gedächtnis meisterten sie beide die ältere Literatur und unterschieden sich darin scharf von einem jetzt nicht selten anzutreffenden Typ von wissenschaftlichen Arbeitern, die sozusagen in einer punktuellen Gegenwart arbeiten, kaum die Entwicklung ihres Faches länger als zehn Jahre verfolgt haben und die historische Ausflüge in die Vergangenheit höchstens dann unternehmen, wenn sie sich daraus für sich selbst oder für die von ihnen vertretenen allgemeinen Ansichten einen Prestigegewinn erwarten. Aus dieser tiefen Verbundenheit mit der geschichtlichen Entwicklung heraus und aus der pietätvollen Ehrfurcht vor ihren großen Männern waren Rollet und Loewi gerechte und zum Urteil berechtigte Beurteiler ihrer Gegenwart und Umwelt. Loewi hat es in einer seiner schönen, in Amerika gehaltenen akademischen Reden als ein Kriterium für wissenschaftliche Intelligenz bezeichnet, ob ein Forscher Wesentliches von Unwesentlichem unterscheiden könne. Es ist klar, daß nur ein Mann diese Bedingungen erfüllen kann, der es gelernt hat, sich einen Überblick zu verschaffen und nicht das zu überschätzen, was gerade Mode ist.

Ein zweiter, wesentlicher Zug, der beiden Männern gemeinsam ist, ist Weltoffenheit: Das Fehlen jedes landschaftlichen, nationalen oder wie wir es heute auch antreffen, kontinentalen Provinzialismus in der Wissenschaft. Wo immer echtes wissenschaftliches Streben wirksam ist, da muß es in freudiger Anerkennung auch fremder Leistung zum Ganzen der Erkenntnis sich hinwenden. Es gibt in diesem Sinne keine fortgeschrittenen und rückständigen Länder, sondern wo immer ein noch so kleiner Schritt vorwärts im echten Bemühen um die Wahrheit gemacht wird, da verdient er Anerkennung und Förderung. Alexander Rollet war privat von nationaler, ja nationalistischer Gesinnung, aber es wäre ihm nie in den Sinn gekommen, solche Gesichtspunkte in das Leben der Wissenschaft zu tragen: Er war ein echter lebenslänglicher Freund seiner russischen Mitarbeiter, er war ein Bewunderer des Pariser Physiologen Marey und seiner unvergleichlichen Registrierkunst. Er setzte sich begeistert für Mareys Idee ein, physiologische Meßwerte zu internationaler Einheitlichkeit zu bringen. Loewi hat immer eine erstaunliche Kenntnis der zeitgenössischen Literatur gehabt und in seinen Veröffentlichungen stets Wert auf genaue Nennung aller an dem Problem Beteiligten gelegt. Beiden Gelehrten war es klar, daß Wissenschaft weder durch allgemeine Ideen weltanschaulicher Natur, noch durch persönliche Zu- oder Abneigung irgendwie in ihrer Freiheit beeinflußt werden kann, ohne schweren Schaden anzurichten.

Es ist festzustellen, daß gegenwärtig nicht nur in Originalbeiträgen zu den verschiedenen Zweigen der theoretischen medizinischen Wissenschaften, sondern gerade auch in Lehrbüchern, welche sich an unerfahrene und desbalb unkritische

Leser wenden, eine Einseitigkeit und Ungerechtigkeit in der Darstellung der Entwicklung und in der Hervorhebung von Einzelleistungen stattfindet, die zu einem Zerfall des einheitlichen Gebäudes der Wissenschaft zu führen droht, einem Zerfall, wie man ihn seit dem Entstehen der gemeinsamen christlich-abendländischen Tradition nicht mehr erlebt hat.

Als letzten gemeinsamen und wichtigen Zug in der wissenschaftlichen Einstellung der beiden großen Vertreter der Grazer medizinischen Schule möchte ich ihre Haltung gegenüber den Anliegen der Kultur im allgemeinen und der Universität im besonderen hervorheben: Beide Männer waren weit davon entfernt, in der Spezialisierung auf ihr Teilgebiet der experimentellen Medizin, oder gar auf Einzelprobleme die Erfüllung ihres Lebens und seiner Aufgaben zu sehen.

Zwar kann man z. B. Rollet durchaus als einen modernen „Spezialisten" ansehen, denn es gibt wohl keinen Biologen, dessen Spezialwissen auf dem Gebiete der vergleichenden Morphologie und Physiologie der quergestreiften Muskulatur mit dem Rollets auch nur verglichen werden könnte, aber seine Interessen reichten weit über dieses Gebiet hinaus. Man kann sagen, daß nicht nur auf dem gesamten Gebiet der Physiologie, sondern sogar der Naturwissenschaften im allgemeinen Rollet interessiert und tätig war. Daneben hat er jederzeit die Gelegenheit wahrgenommen, um seinen Mitmenschen durch sein Talent zur Organisation und durch seine Anteilnahme an ihrem Wohlergehen zu helfen: Er hat sich nachdrücklich für die Freiheit der Lehre an den Universitäten eingesetzt, er war maßgeblich beteiligt an dem Zustandekommen der Deutschen Naturforscher- und Ärzteversammlung in Graz. Bei den Studenten galt er als ein gerechter, stets für ihr Wohlergehen wirkender Rektor.

Auch Loewi war weit davon entfernt, im Spezialistentum aufzugehen. Er hat durch Anregungen und Gespräche, durch Kritik an Büchern der Weltliteratur, an Konzerten, Ausstellungen usw. alle seine Schüler immer wieder darauf hingewiesen, daß fruchtbare Ideen auch auf dem Gebiet der Spezialwissenschaften nicht entstehen können, wenn sich der menschliche Geist nicht der Kultur als solcher und ihren Wertskalen positiv zuwendet. Im Gegensatz zu der heute oft vorherrschenden Meinung, es sei bei der zunehmenden Ausdehnung und bei dem ins Unermessene gehenden Wachstum der Naturwissenschaft unmöglich, sich mit dem Ganzen der europäischen Kultur fruchtbar auseinanderzusetzen, haben diese Männer uneingeschränkt das Ideal der universitas literarum hochgehalten.

Mag man nun der Meinung sein, daß noch viele andere Vorbedingungen erfüllt sein müssen, damit Wissenschaft gedeihe: Mag man mit Theodor Fontane sagen, daß nur der Ernst den Mann, nur der Fleiß das Genie mache, und hervorheben, wie selten geniale Begabungen anzutreffen sind; und mag man schließlich immer wieder betonen, daß nur an jenen Orten dieser Erde, an denen sich Wohlstand und Reichtum anhäufen, der volle technische Fortschritt und die volle Ausschöpfung naturwissenschaftlicher Möglichkeiten erfolgt, so bleibt doch alles dies von untergeordneter Bedeutung. Die wahren Wurzeln der Wissenschaft, aus denen sie Kraft und Erneuerung des Einzelnen zieht, bleiben unverrückt die oben Aufgezeigten: Ehrfurcht vor der Vergangenheit, die zu gerechter Beurteilung der Gegenwart führt; Weltoffenheit, die das Wertvolle überall anerkennt, wo es hervortritt und die Freiheit des Geistes bewahrt, und endlich eine positive Einstellung zu den Wertskalen des menschlichen Daseins und der menschlichen Kultur in ihrer Gesamtheit.

B. Referate

R. Wagner (München): Das Regelproblem in der Biologie

Mit 4 Textabbildungen

Das Dasein — also der Bestand des Lebens — kann unserem Verständnis nur nähergebracht werden, wenn man jene Einrichtungen zu begreifen versucht, die trotz aller Störungen aus der Umwelt es immer wieder von neuem bewirken, daß die Voraussetzungen für den Ablauf der Lebensprozesse unverändert aufrechterhalten bleiben. Während die vegetativen Mechanismen für die einzelnen Zellen (für die Partner des ganzen Zellstaates) eine Konstanz der Umweltsbedingungen einzustellen bestrebt sind und im Sinne von Cl. Bernard das „Milieu interne" konstant erhalten, fällt den animalischen Funktionen die Aufgabe zu, den Gesamtzellstaat mit seiner Umwelt stets wieder ins Gleichgewicht zu setzen, wenn durch Störkräfte aus der Umwelt solches Gleichgewicht bedroht ist.

Um die biologisch wichtigen Zustandsgrößen für die Zellpartner und für den ganzen Zellstaat, trotz aller Störkräfte, konstant zu halten, hat die Natur — wie es scheint — ein universelles Prinzip in Anwendung gebracht, das bis in die letzten Einzelheiten jenen Prinzipien ähnlich ist, welche die Techniker heutzutage anwenden, wenn sie eine Zustandsgröße konstant zu halten bestrebt sind. Zwei Möglichkeiten gibt es von vornherein, um eine Homoiostase zu erreichen, also eine Zustandsgröße konstant zu halten: entweder diese Größe wird von einer übergeordneten Befehlsstelle aus eingestellt, d. h. sie wird gesteuert. In diesem Falle ist das Ergebnis eines derartigen Befehles für die Erteilung weiterer zukünftiger Befehle unmaßgeblich, beziehungsweise das Befehlsergebnis wird für eine weitere Befehlsgebung nicht verwertet. Die zweite Möglichkeit, eine Konstanz von Zustandsgrößen zu erzielen, besteht darin, daß die Größe, die konstant gehalten werden soll, dauernd überwacht wird. Jegliche Abweichung von der Konstanz wird durch Gegenmaßnahmen korrigiert.Wo aber dieser Weg einer fortlaufenden Überwachung und Korrektur beschritten wird, trifft der Begriff „Regelung" zu. Soweit man sehen kann, ist bei den biologischen Mechanismen das Prinzip der Regelung zur Konstanterhaltung lebenswichtiger Zustandsgrößen in Anwendung gebracht. Regelmechanismen, welche eine Zustandsgröße konstant halten, heißt man „Halte-Regler".

Damit Regelung überhaupt möglich ist, muß ein in sich geschlossener Funktionskreis vorhanden sein — eine in sich geschlossene Kausalkette.

Der Vorgang, der sich dann in solchem Funktionskreis abspielt, wird zur Voraussetzung seiner selbst. Solche Systeme müssen also auf sich selbst zurückwirken, d. h. ein Teil der Energie, die in solchen Systemen umgesetzt wird, muß dazu verwendet werden, um den Energiestrom im Gesamtsystem mit Hilfe einer Signalgebung zu steuern. Die Energiemenge, die zur Signalgebung benützt wird, ist hierbei vernachlässigbar klein im Vergleich zum Gesamtenergiestrom, der durch das System hindurchgeht. Von der funktionellen Seite her betrachtet wurde eine derartige Rückwirkung auf sich selbst erstmals an den motorischen Vorderhornganglienzellen des Rückenmarks beobachtet und beschrieben, und der Vorgang wurde 1925 als „Rückkoppelung" der Vorderhornganglienzellen bezeichnet. Ein Vierteljahrhundert später wurde diese Bezeichnung „Rückkoppelung" wieder aufgegriffen und die Rückmeldungen, welche einen späteren Befehl in solchem Funktionskreis beeinflussen und modifizieren, wurden von v. Holst „Reafferenzen" genannt. Unterdessen hat in den letzten Jahren der Begriff der „Cybernetic" sich (besonders in der amerikanischen Literatur) ausgebildet und es wurde das allgemein gültige Organisationsprinzip solcher Systeme von N. Wiener besonders in den Vordergrund gestellt. Hierbei ist das „fead back" dieser Betrachtungsweise kein anderer Begriff, als jener, der früher schon mit dem Wort Rückkoppelung erschöpfend bezeichnet wurde.

Ehe auf das Grundsätzliche und auf Einzelheiten solcher biologischer Regler eingegangen wird, soll die Frage aufgeworfen werden, ob diese neue Betrachtungsweise Vorteile bringt gegenüber der bisherigen und ob man nicht vielleicht einfach nur alten Wein in neue Schläuche gießt. Wodurch unterscheidet sich diese Betrachtung biologischer Vorgänge vom Standpunkt der Regelung von den bisherigen und inwiefern führt sie weiter als die alte Betrachtungsweise, z. B. jene der „Lehre von Reflexen"? Durch die Regeltechnik, wie sie in den letzten 2 Dezennien einen enormen Aufschwung nahm, ist eine neue Begriffswelt entstanden. es sind die Gesetzmäßigkeiten aufgedeckt und klargestellt worden, nach denen solche in sich rückgekoppelte Systeme funktionieren und es hat sich die Möglichkeit ergeben, quantitative Betrachtungen über die Eigenschaften solcher Regler, die einer Konstanterhaltung von Zustandsgrößen dienen, anzustellen, wo dieses bisher nicht möglich war. Unsere bisherige Reflexlehre z. B. wäre zu vergleichen mit Untersuchungen, die der Techniker an einem sogenannten „aufgeschnittenen Regelkreis" anstellt. Löst man z. B. durch Zerren an einem Skelettmuskel einen Eigenreflex in diesem aus, so interessierte bisher im Sinne der Reflexlehre hauptsächlich die Beziehung zwischen Reiz und der Reflexaktion des Muskels. Vom Standpunkt der Regelung aus betrachtet interessiert uns aber an diesem Vorgang wesentlich mehr. Der mechanische Reflexerfolg im Muskel erzeugt im rückgekoppelten System

von sich aus wieder einen adäquaten mechanischen Reiz in den Muskelspindeln und den Golgi-Organen und diese schicken nun ihrerseits wieder im intakten Funktionskreis Impulse zu den Vorderhornzellen zurück, so daß die späteren efferenten Impulse aus diesen beeinflußt und modifiziert werden. Es laufen also Erregungen im Kreise herum. Die Rückwirkung dieser Systeme auf sich selbst wurde von der Reflexlehre nicht in Betracht gezogen. Damit soll nicht gesagt sein, daß die gute alte Reflexlehre nicht die wesentlichsten Voraussetzungen geschaffen hat, um überhaupt weitergehende Untersuchungen über biologische Regelung durchführen zu können. Es soll schon an dieser Stelle bemerkt werden, daß als rückgekoppelte lebende Systeme, die vom Standpunkt der Regelung aus zu betrachten sind, nicht nur solche in Frage kommen, welche auf dem Nervenwege rückgekoppelt sind, sondern auch alle jene, welche andere Möglichkeiten der Organ-Korrelation und Signalgebung zur Rückkoppelung benützen, seien es hormonale Vorgänge oder seien es Stoffwechselvorgänge überhaupt. Wenn auch dem Werte des Analogieschlusses von erkenntnistheoretischer Seite scharfe Grenzen gezogen sind, so ist doch sein heuristischer Wert ungeheuer und seine kritische Anwendung wird es gestatten, für verschiedene Vorgänge, die bisher kaum miteinander vergleichbar schienen, einen gemeinsamen Nenner zu finden, Splitter menschlicher Erkenntnis, die auseinanderzufallen drohen, wieder zu sammeln und unter dem übergeordneten Gesichtspunkt biologischer Regelung wieder zu einem Gesamtbild zusammenzufügen. Auf dem Wege zu einer Resynthese in der Biologie erscheint mir diese Betrachtungsweise fruchtbar.

Ehe ich nun auf besondere Ergebnisse solcher Reglerbetrachtung des Lebenden eingehen kann, ist es vielleicht doch nötig, kurz einige Grundprinzipien der Regelung darzulegen, wobei ich hier wegen der Kürze der Zeit nur das Allernötigste bringen kann und nur jene Gesichtspunkte herausheben möchte, die für die Betrachtung der Lebensvorgänge wichtig und neu erscheinen.

Irgendeine Zustandsgröße, die lebenswichtig ist, soll konstant gehalten werden. Man heißt diese Größe die „Regelgröße". Im Betriebe unseres Organismus kann man bei dieser Regelgröße an die Temperatur, an den mittleren Blutdruck, an die Wasserstoffionenkonzentration, an die CO_2-Spannung, an den osmotischen Druck der Körpersäfte, an den Blutzuckerspiegel (oder an irgendeine andere lebenswichtige Zustandsgröße) denken. Jeder denkt am besten an das, was seinem eigenen Arbeits- und Interessengebiet am nächsten liegt. Diese Größe — die Regelgröße — soll auf einen möglichst konstanten Wert, den *Sollwert* eingestellt werden. Durch Störungen aus der Umwelt kommen Abweichungen von diesem Sollwert zustande und der Wert ist deshalb nicht so wie er sein soll. Jenen Wert, der wirklich ist, bezeichnet man als den

Istwert. Der Wert, den die konstant zu haltende Zustandsgröße hat, wird durch einen Fühler kontrolliert. Im biologischen Geschehen sind diese Fühler Receptorfelder, welche entweder durch afferente Nerven — oder aber auf hormonalem Wege — Wirkungen auslösen. Fühler (bzw. Receptor plus Meldevorrichtung), seien es afferente Nerven oder auf dem Blutweg beförderte Hormone sind das Meßwerk eines solchen biologischen Reglers. Im einfachsten Fall eines Reglers kann das Meßwerk direkt auf die Regelgröße Einfluß nehmen, z. B. trifft das in der Technik bei einem mit Gas geheizten Brutschrank zu, wo das Thermometer, wenn es steigt, direkt den Gasstrom drosseln, wenn es sinkt den Gasstrom direkt verstärken kann. Wenn die Regelgröße derart direkt vom Meßwerk aus beeinflußt wird, handelt es sich um direkte Regler. In den meisten Fällen ist jedoch eine solche direkte Beeinflussung der Regelgröße durch das Meßwerk nicht möglich, teils weil keine direkte Angriffsmöglichkeit für den Fühler besteht, um die Regelgröße zu ändern, teils weil die Kräfte, die vom Fühler aus wirksam werden können, zu klein sind, um die Regelgröße zu ändern. Den räumlichen Bereich, in dem eine für die Funktion wichtige Zustandsgröße konstant gehalten werden muß, heißt man die Regelstrecke oder das Verstellsystem. Also z. B. für die Temperaturregelung unseres Organismus wäre der Wärmekern des Körpers, für die Blutdruckregelung der Aortenwindkessel und die großen Arterien, für die Osmoregulation der Gesamtorganismus usw. die Regelstrecke bzw. das Verstellsystem. Im Bilde würde sich solch ein direkter Regler wie folgt schematisch darstellen (Abb. 1).

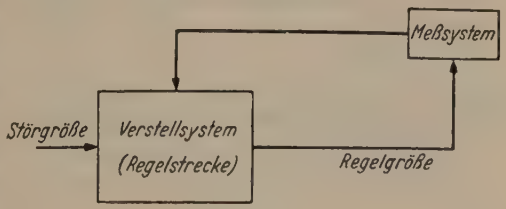


Abb. 1

Schon an diesem einfachsten Regler ist etwas zu bemerken, was für alle Regler gilt und was ich im biologischen Zusammenhang schon jetzt unterstreichen möchte. Es kann in diesem, in sich geschlossenen Kreis nur eine einzige Wirkungsrichtung in Betracht kommen. Nur in Richtung der Pfeile kann Signalgebung erfolgen und nie umgekehrt. Wo es sich bei biologischen Reglern z. B. um nervöse Korrelationsmechanismen handelt, scheint deshalb von vornherein eine antidrome Leitung nicht möglich zu sein. Auch für Regler mit hormonalem Übertragungsmechanismus scheint eine Umkehr der Wirkungsrichtung gleichfalls ausgeschlossen.

Wenn das Meßwerk (so wie meistens bei biologischen Reglern) wegen Fehlens direkter Angriffsmöglichkeit oder wegen zu geringer Kräfte die Regelgröße nicht beeinflussen kann, müssen Hilfseinrichtungen verwendet

werden. Es müssen Verstärkereinrichtungen vorhanden sein und ein die Kräfte der Verstellung beherrschendes Zentrum muß einen Stellmechanismus — einen sogenannten Stellmotor — betätigen. In diesem Fall ist der Regelkreis ein bißchen komplizierter als bei einem direkten Regler und er stellt sich dar, wie im Schema des nächsten Bildes zu sehen ist (Abb. 2).

Da das Meßwerk nicht direkt wirken kann, wirkt es auf einen Stellmotor, dessen Leistung — also dessen Energieumsatz — groß genug ist, um die Regelgröße zu beeinflussen und der auch einen Angriffsmechanismus zur Beeinflussung der Regelgröße besitzt. Dies ist eine indirekte Regelung; wo der Fühler mit dem Verstärker zusammengefaßt ist, spricht man auch von mittelbarer Regelung.

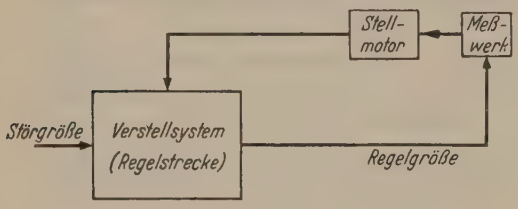


Abb. 2

Die Konstanterhaltung der Regelgröße wird nun dadurch bewirkt, daß durch eine Gegenwirkung auf die Regelgröße jede Verminderung ihres Istwertes zu einer Erhöhung desselben und jede Erhöhung des Istwertes zu einer Verminderung desselben führt. Im Organismus ist das Wechselspiel von Erregung und Hemmung die Voraussetzung für das Einbalancieren einer konstant zu haltenden Regelgröße auf einen bestimmten Sollwert. Es ist hier bereits im biologischen Zusammenhang zu bemerken, daß eine Konstanterhaltung lebenswichtiger Zustandsgrößen unmöglich erscheint, wenn es keine Hemmung, z. B. keine zentralnervöse Hemmung gäbe. Auch der Organismus hat in seine mittelbar wirkenden Halteregler Verstärker eingebaut, welche die schwachen afferenten Impulse aus den Receptoren derart verstärken, daß sie den Stellmechanismus, der die Regelgröße beeinflußt, betätigen können. Die afferenten Impulse aus den Blutdruckzüglern führen z. B. dazu, daß über die kräftebeherrschenden Zentren der Medulla hinweg unter anderem die glatte Gefäßwandmuskulatur betätigt wird. Die geringe Energie, welche durch vasomotorisch wirksame Nerven der Gefäßwandmuskulatur als Erregungsenergie zukommt, mobilisiert im Muskel einen vielmals größeren Energiebetrag, welcher dann dazu ausreicht z. B. entgegen den Kräften des Blutdruckes eine Vasokonstriktion zu bewirken. Die Verstärkung vollzieht sich hier also im Stellmotor selbst. Auch bei Regelkreisen, die im Verbande jener Mechanismen wirksam sind, die der Willkürbewegung dienen, erfolgt die Verstärkung durch den Übergang der Erregungsenergie auf den Skeletmuskel. Der Verstärkungsgrad entspricht dann dem Verhältnis der Erregungsenergie im Nerven zu der im Muskel freigesetzten mechanischen Energie. Er beträgt also viele Potenzen von 10.

Damit eine Abweichung der Regelgröße vom Sollwert durch den Fühler bemerkt werden kann, so daß dieser über das kräfteregulierende Zentrum eine Gegenmaßnahme auslöst, muß die Abweichung einen bestimmten Minimalbetrag übersteigen. Jeder Receptor in biologischen Regelkreisen und jeder Fühler eines technischen Reglers hat eine bestimmte minimale Einwirkung nötig, damit er anspricht, er hat eine bestimmte Empfindlichkeit und es muß sein Schwellenwert überschritten werden, ehe er auf die Veränderung eines Zustandes reagiert. In der Regeltechnik bezeichnet man die Differenz jener Grenzwerte, auf die der Fühler eben noch nicht anspricht (in ihrer Relation zum Sollwert) als den Unempfindlichkeitsgrad des Fühlers. In der physiologischen Nomenklatur würde man dies als die Größe jenes Reizes bezeichnen, der die Unterschiedsschwelle eben noch nicht überschritten hat. Dieser Wert — also die Unterschiedsschwelle — ist für die gesamte Empfindlichkeit, mit der ein biologischer Regler anspricht, von entscheidender Bedeutung und die Gesamtregelung hat im Minimum jenen Empfindlichkeitsgrad, den der Fühler hat, denn ehe dieser nicht auf eine Änderung des zu regulierenden Wertes anspricht, kann im ganzen Regelsystem nichts erfolgen. Im Organismus kommen alle jene Stellen als Fühler von biologischen Regelsystemen in Betracht, welche Orte höchster Empfindlichkeit für eine Zustandsänderung sind. Diese allbeherrschende Bedeutung der Stelle größter Empfindlichkeit für eine Zustandsänderung in lebenden Systemen, dürfte wahrscheinlich nicht nur im Zellstaat, sondern bereits innerhalb der kleinsten lebensfähigen Einheit von Bedeutung sein. Stets ist es der locus minoris resistentiae, der als Fühler eines Regelkreises funktioniert und die zur Gleichgewichtserhaltung erforderliche Gegenmaßnahme auslöst. Um einige Beispiele aus vielen herauszugreifen: Man kann z. B. den Vorgang der Zellteilung von der funktionellen Seite her so auffassen, daß bei Wachstum und Größenzunahme einer Zelle die Stoffversorgung, z. B. die Sauerstoffversorgung für die zentral gelegenen Partien des Zelleibes, immer schlechter wird, weil die Diffusionswege dorthin immer länger werden und auch weil die Oberfläche quadratisch, der Inhalt der Zelle aber mit der dritten Potenz ihrer linearen Dimensionen wächst. In diesen zentralen Teilen der Zelle, an dem Ort schlechtester Versorgung, liegt der Zellkern, der die Stoffwechselnot zuerst spüren muß. Als Fühler und Stellglied eines Stoffwechselreglers veranlaßt er als Gegenmaßnahme gegen die Stoffwechselnot eine Zellteilung, was zur Verkleinerung der Diffusionswege, zur Vergrößerung der relativen Zelloberfläche und damit zur Behebung der eingetretenen Stoffwechselnot führt.

Ein anderes Beispiel seien die Receptorfelder der Blutdruckzügler, die in Aorta und Carotissinus auf Blutdruckänderungen zuerst ansprechen und als Fühler (als locus minoris restistentiae) eine Gegenmaßnahme in

bekannter Weise auslösen, in einem System, das als völlig in sich geschlossener Regelkreis erkannt und anzusehen ist.

Auch die Mechanismen der Thermoregulation, auf die ich später nochmals zurückkomme, könnte man als Beispiel bringen.

Um ein Beispiel für einen biologischen Regler mit hormonaler Signalgebung herauszugreifen, möge man an die Beeinflussung des Blutzuckerspiegels durch das Insulin denken. Die β-Zellen im Inselapparat des Pankreas reagieren auf Erhöhung des Blutzuckerspiegels mit besonders starker Stoffwechselzunahme, wie vor kurzem von Stier gezeigt wurde. Sie sind der Fühler eines Reglers für den Blutzucker. Durch einen chemischen Mechanismus, der dem in diesen Zellen deponierten Insulin wahrscheinlich das Zink wegnimmt, wird Insulin frei und ins Blut ausgeschüttet (vgl. H. Maske) was in bekannter Weise zu Gegenmaßnahmen gegen die Erhöhung des Blutzuckerspiegels führt, wobei die Leber und die zuckerverbrauchenden Organe als Stellglieder dieses in sich geschlossenen Regelkreises funktionieren. Dies wäre ein Beispiel für einen Regelkreis mit hormonaler Signalgebung. Wenn man sich frägt, was dieser Regelkreis im Organismus soll, welche Aufgabe er zu erfüllen hat, dann ist folgendes naheliegend anzunehmen: wahrscheinlich reagieren alle Zellen auf erhöhtes Zuckerangebot mit Stoffwechselzunahme unter der Herrschaft des Massenwirkungsgesetzes. Dadurch, daß die β-Zellen besonders empfindlich sind und als Fühler eines Reglers ansprechen, der den Blutzuckerspiegel nicht hochsteigen läßt, wird das Kollektiv aller Zellen, der Zellstaat, für die Wirkung eines Stoffes, nämlich des Traubenzuckers, auf die Zellen von der Diktatur des Massenwirkungsgesetzes befreit.

Schließlich ist (um ein letztes Beispiel für die Fühlerwirkung biologischer Regler zu bringen) besonders eindrucksvoll die Bedeutung der Stelle höchster Empfindlichkeit im Atemapparat demonstriert, wo in bekannter Weise das Atemzentrum selbst und seine Receptoren im glomus caroticum, als erste auf Änderungen im Gasgehalt des Blutes ansprechen, was zur Folge hat, daß dieses kräftebeherrschende Zentrum im Sinne eines Reglers mit Hilfe seiner Efferenzen den Stellmotor — also den Atemapparat — derart betätigt, daß durch erhöhte Ventilation der status quo ante für den Gasgehalt des Blutes möglichst angenähert wieder herbeigeführt wird. Eine große Zahl solcher altbekannter Beispiele ließe sich für dieses im Organismus verwirklichte Urprinzip einer Regelung vermittelst einer Kontrolle durch Fühler noch vorbringen.

Bemerkenswert für das Meßwerk biologischer Regler, die mit Nervenübertragung arbeiten, ist noch die Tatsache, daß die Signalgebung im Regelkreis nicht durch Amplituden, sondern durch Frequenzmodulation erfolgt. Auch die Techniker haben die Überzeugung gewonnen, daß Frequenzmodulation zur Übermittlung von Signalen verläßlicher ist als die leichter störbare Amplitudenmodulation.

Was die Meßwerke biologischer Regler betrifft (also Receptoren plus Übertragungsapparat auf die kräfteregulierenden Zentren und weiterhin auf den Stellmechanismus), so scheint für die Lebensprozesse von ganz besonderer Bedeutung zu sein, daß diese Fühler nicht nur auf die Abweichung der Regelgröße vom Sollwert ansprechen, sondern (in vielen der Beobachtung zugänglichen Fällen) noch durch die zeitliche Änderung der Regelgröße mitbeeinflußt werden. Sie haben eine Differentialquotientenempfindlichkeit für Zustandsänderungen nach der Zeit. Auch der Techniker baut Regler, deren Fühler diese Eigenschaften besitzen, und er erzielt hierdurch häufig eine größere dynamische Stabilität bei der Konstanterhaltung einer Zustandsgröße.

Für die verschiedenen technischen Regler läßt sich von Fall zu Fall in mathematischer Beweisführung zeigen, ob ihre Fähigkeit zur Konstanterhaltung der Zustandsgröße (ihre dynamische Stabilität) verbessert oder verschlechtert wird, wenn man den ersten Differentialquotienten — also die zeitliche Änderung der Regelgröße — zur Regelung eines Zustandes mitbenützt. Es muß allerdings betont werden, daß man zu Regelungen die zeitliche Änderung der Regelgröße nur *mit*benützen kann, daß aber mit dem Differentialquotienten allein, ohne die absolute Abweichung der Regelgröße vom Sollwert zu erfassen, nicht geregelt werden kann, worauf ich im Zusammenhang mit der Thermoregulation nochmals zurückkommen werde. Regler, deren Meßwerk nicht nur auf die Abweichung der Regelgröße vom Sollwert, sondern auch auf die zeitliche Änderung dieser Abweichung anspricht, heißt man in der Technik Vorfühlregler bzw. Vorhaltregler oder sogenannte PD-Regler. Es scheint, als ob im Organismus für Regelung von Zustandsgrößen hauptsächlich Vorhaltregler in Anwendung gebracht worden sind, denn für die meisten Receptorfelder hat sich ergeben, daß sie auch auf Zustandsänderungen nach der Zeit mit Erregung ansprechen. Je nachdem für welchen adäquaten Reiz die nervösen Endorgane in den Receptorfeldern gebaut sind, sprechen sie auf thermische, mechanische, chemische Zustandsänderungen an und es kommt in ihnen eine Ureigenschaft (gleichsam auf die Spitze getrieben) zum Vorschein, die man an aller irritablen Substanz, sei es am Nerven, am Muskel usw. ja selbst am nicht differenzierten Protoplasma eines Einzellers beobachten kann. Eine Empfindlichkeit für Zustandsänderungen besteht bekanntlich beim Nerven nicht nur für elektrische, sondern auch für mechanische, thermische, chemische Einwirkungen usw.

Wo man die Regelung im Organismus unter dem Gesichtspunkt der Funktion von Vorfühlreglern (bzw. Vorhaltreglern) betrachten darf, ergeben sich aber in allgemein biologischer Hinsicht und für die philosophische Betrachtungsweise der Lebensvorgänge noch besondere Perspektiven. Es ist zu bedenken, daß ein Vorfühlregler nicht nur die

gegenwärtige Situation mit Hilfe seines Fühlers kontrolliert, sondern daß er wegen der Differentialquotienten-Empfindlichkeit seines Meßwerkes, darüber hinaus die sehr bemerkenswerte Eigenschaft hat, in die Zukunft hinaus zu extrapolieren zu können. Er extrapoliert mit jener Wahrscheinlichkeit richtig, mit der eine zunehmende Abweichung vom Sollwert ohne Gegenmaßnahme weiterhin zunimmt und mit der eine abnehmende Abweichung vom Sollwert ohne Gegenmaßnahme mit der Zeit weiterhin abnimmt. Völlig richtig ist solche Extrapolation allerdings nur für eine unendlich kleine Strecke jener Zeitabszisse, die von einem Zeitpunkt der Gegenwart zu einem Zeitpunkt der Zukunft führt, also für eine unendlich kleine Zeitspanne. Je größer diese Zeitspanne wird — also je weiter in die Zukunft hinaus extrapoliert werden soll —, desto kleiner ist der Wahrscheinlichkeitsquotient, daß solche Extrapolation das Richtige trifft. Für die Stabilisierfähigkeit solcher Regler fangen also Wahrscheinlichkeitsquotienten eine Rolle zu spielen an und alles, was zur Erhaltung eines lebenswichtigen Zustandes für die Zukunft geschieht, ist mit einem „vielleicht" behaftet. Jedenfalls kann auch leblose Materie, wenn sie nach Art eines Vorfühlreglers organisiert ist zukunftsträchtig werden. Da es sich bei den Fühlern biologischer Regler und bei der irritablen Substanz überhaupt um differentialquotienten-, empfindliche Systeme handelt und bereits dem undifferenzierten Protoplasma eine Empfindlichkeit für Zustandsänderungen nach der Zeit zugeschrieben werden muß, ist dieses allein schon wegen seiner Differentialquotientenempfindlichkeit — nach Art eines Vorfühlreglers — zukunftsträchtig geworden. Die Zukunftsträchtigkeit des Lebenden, nämlich in der Gegenwart so vorzusorgen, daß für die Zukunft das Dasein — jener das Leben kennzeichnende Gleichgewichtszustand — aufrecht erhalten bleibt, läßt sich also bereits durch rein physikalische Annahmen dem Verständnis näher bringen, wenn man die Lebensvorgänge vom Standpunkt jener Regelmechanismen aus betrachtet, die man in Physik und Technik als Vorfühlregler bezeichnet. Durch Organisierung von Materie nach Art von Vorfühlreglern kommt eine völlig neue Eigenschaft in die Materie hinein, nämlich eine Zukunftsträchtigkeit. Diese Differentialquotientenempfindlichkeit auf dem Gebiete biologischer Regelung läßt sich von den einfachsten Lebensvorgängen bis hinauf zu den höchsten zentralnervösen, psychischen Reaktionen verfolgen. Zum Beispiel zur Erhaltung unseres Daseins regeln wir die Beziehungen zwischen uns und der Umwelt nicht nur nach dem Zustand, der momentan besteht — also nach dem Niveau, auf dem wir uns gerade befinden —, sondern auch danach, ob es weiterhin mit uns aufwärts oder abwärts geht.

Einem erstmaligen störenden Ereignis in der Umwelt steht der biologische Regler dabei genauso gegenüber wie ein rein physikalisch funktionierender Regler. Durch Wiederholung des Ereignisses wird er aber

dem rein physikalischen Regler überlegen. Nach Ablauf einer biologischen Regelung scheinen dauernde Veränderungen im lebenden System bestehen zu bleiben, es bilden sich gleichsam Engramme aus, deren Mitverwertung für das Ergebnis künftiger Regelungen von Wichtigkeit ist. Mit größerer Wahrscheinlichkeit läßt sich die Beseitigung einer Störkraftwirkung für die Zukunft erreichen, wenn solche Engramme früher erfolgter Regelungen vorhanden sind, als wenn solche Engramme fehlen. Es muß bemerkt werden, daß der Techniker bereits Apparate baut, welche das Ergebnis früher erfolgter Regelungen für zukünftige Regelungen mitbenützen und welche Engramme speichern. Je häufiger die Inanspruchnahme, desto größer, je seltener, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, daß der biologische Regler die Wirkung einer Störung beseitigt. Für die Über- und Unterordnung koordinativ wirkender Zentren, im Zentralnervensystem, spielt die Wahrscheinlichkeit, mit der sie in Anspruch genommen werden, eine überragende Rolle, und ein Zentrum liegt im allgemeinen um so höher, je geringer die Wahrscheinlichkeit seiner Inanspruchnahme ist, je seltener also die Aufgabe ist, die es erfüllen muß. Wo es sich um ein erstmaliges und einmaliges Ereignis handelt, das als Störkraft wirkt, scheint eine Regelung überhaupt nicht möglich. Infolge der Erstmaligkeit besitzt der biologische Regler von früher her keine Engramme und infolge der Einmaligkeit, der keine Wiederholung folgt, gibt es für die Zukunft überhaupt nichts zu regeln. Man ersieht, welche überragende Bedeutung für die Ausdifferenzierung biologischer Regler in Richtung höchster zentralnervöser Funktionen die Wiederholung der Umweltsvorgänge hat, also die Wahrscheinlichkeit, mit der sie eintreten. Die zu selbsttätiger Regelung führende Übung — als Folge der Wiederholung — gibt der höheren Stelle überhaupt erst die Freiheit sich mit dem Unwahrscheinlichen zu befassen, und die Freiheit einer übergeordneten Stelle hängt ganz allgemein stets vom Funktionieren eines untergeordneten Automatismus, von einer untergeordneten selbsttätigen Regelung ab.

Wenn der Regelkreis eines biologischen Haltereglers eine Größe auf konstant einzustellen bestrebt ist, so ist dies nur durch fortgesetzte Korrekturen der Regelgröße nach oben und unten möglich. Es müssen also stets Schwankungen um den Sollwert vorhanden sein. Diese Schwankungen heißt man Regelschwankungen und sie hängen eng zusammen mit bestimmten Typen biologischer Rhythmen, auf die seinerzeit A. Bethe hingewiesen hat. Ob man die Traube-Hering-Schwankungen des Blutdruckes, die Schwankungen des Blutzuckerspiegels um seinen Sollwert, die Temperaturschwankungen unseres Organismus oder etwa den Tremor bei bestimmter Skeletmuskelbeanspruchung (etwa bei maximaler Gelenkversteifung) betrachtet, in allen Fällen läßt sich wahrscheinlich machen, daß der Mechanismus eines in sich geschlossenen

Funktionskreises dahintersteckt, welcher die Tendenz hat, den Sollwert einer Regelgröße konstant aufrecht zu erhalten. Wie beim Fahren mit dem Auto auf gerader Strecke braucht es fortgesetzt Korrekturen, um auf der geraden Strecke zu bleiben.

Bei den Reglern der Technik und jenen im Organismus ist es oft nötig, eine Zustandsgröße, die ein Regler konstant auf einem bestimmten Sollwert zu halten bestrebt ist, auf einen anderen Wert einzustellen und auf diesem dann konstant zu halten. Solchem Zwecke dienen Sollwerteinsteller. Eine Verstellung des Sollwertes kann auf sehr verschiedene Weise geschehen und von den verschiedenen technischen Möglichkeiten, die dazu führen, soll hier nur in den Vordergrund gestellt werden, daß z. B. der Einfluß der Regelgröße auf das Meßwerk geändert werden kann, indem man die Fühlerempfindlichkeit verlagert. Dies ist ein Verfahren, von dem im Falle biologischer Regelung Gebrauch gemacht wird. Durch Änderung der Fühlerempfindlichkeit kann der Sollwert, auf den der Regler einspielt, auf ein anderes absolutes Niveau verlegt werden. Um nur ein Beispiel herauszugreifen, denke man an die Tendenz zur Konstanterhaltung der Netzhautbeleuchtung durch die Pupille. Dieser Vorgang kann sich im Bereiche sehr verschiedener absoluter Lichtintensitäten abspielen, wahrscheinlich deshalb, weil der Fühler dieses Halteregelrs, nämlich die Netzhaut, innerhalb sehr weiter Grenzen seine Empfindlichkeit ändern kann. Hier handelt es sich um eine Sollwertverstellung, hervorgebracht durch Empfindlichkeitsänderung des Fühlers im Beleuchtungsregler. Auch manche andere Receptoren lassen sich so unter dem Gesichtspunkt einer Sollwertsverstellung betrachten, z. B. die Muskelspindeln in den Skeletmuskeln, die Receptorfelder der Blutdruckzügler usw. Leider kann wegen der Kürze der Zeit auf solche Einzelheiten hier nicht eingegangen werden.

Wie weit die Betrachtung der Lebensvorgänge unter dem Gesichtspunkt einer Regelung in geschlossenen Funktionskreisen über die bisherigen Reflexbetrachtungen an aufgeschnittenen Funktionskreisen hinausgeht, wird einem besonders bewußt, wenn man bedenkt, daß in vielen Fällen, wo es sich um Regelung handelt, wahrscheinlich das Bestehenbleiben eines *Restreizes* die Voraussetzung dafür bildet, daß ein neuer Gleichgewichtszustand zwischen dem lebenden System und der Umwelt aufrechterhalten werden kann. Es ist wahrscheinlich geworden, daß die im Organismus verwendeten Regler im Sinne des Technikers Regler mit Stellungszuordnung sind (sogenannte P-Regler) oder mit anderen Worten, daß es sich hauptsächlich um Vorgänge einer sogenannten Rückwärts-Regelung handelt. In allen Fällen, wo dieses Prinzip der Rückwärts-Regelung angewendet ist, muß ein Restreiz nach Kompensation der Störung noch bestehen bleiben, d. h., solche Halteregler können die Wirkung einer Störkraft nie 100%ig beseitigen.

Ein möglichst einfaches Schema möge zeigen, um was es sich handelt. Ich habe das Schema eines Druckreglers hier abgebildet. In diesem Rohr soll ein möglichst konstanter Druck herrschen, wenn Flüssigkeit oder Gas hindurchströmt. Das Rohr ist die Regelstrecke. Der Fühler, der den Druck kontrolliert, ist das Quecksilbermanometer. Es überträgt seinen Ausschlag auf einen doppelarmigen Hebel, der hier seine Drehachse habe. Der ganze Übertragungsmechanismus ist das Meßwerk dieses Reglers. Der doppelarmige Hebel betätigt an seinem anderen Ende das Stellglied.

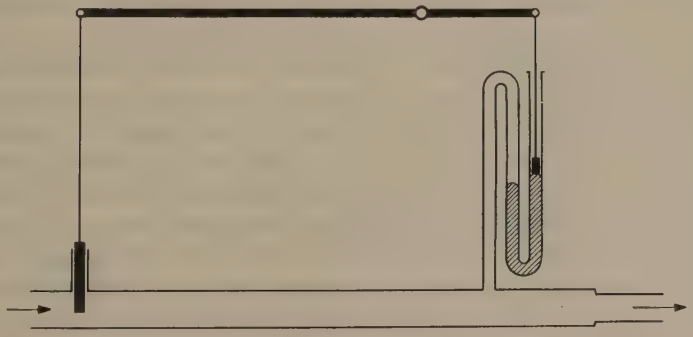


Abb. 3

Dies sei im einfachsten Fall ein Schieber, der den Zustrom mehr oder weniger stark drosselt. Steigt der Druck in der Regelstrecke, dann steigt der rechte Quecksilbermeniskus, und dessen Bewegung überträgt sich über den doppelarmigen Hebel auf den Schieber derart, daß dieser den Zufluß stärker drosselt, was aus bekannten Gründen eine Druckverminderung im Rohr — also in der Regelstrecke zur Folge hat. Der Grund, warum dieses simple Schema hier gezeigt wird, ist folgender: es ist hier leicht einzusehen, daß jeder bestimmten Stellung des Quecksilbers im Manometer (im Fühler dieses Reglers) eine ganz bestimmte Stellung des Schiebers (des Stellgliedes dieses Reglers) zugeordnet ist. Das ist also ein Regler mit Stellungszuordnung. Die Verstärkung in diesem Regler ist durch die Hebelvergrößerung des doppelarmigen Hebels gegeben. Je weiter man den Drehpunkt des doppelarmigen Hebels nach rechts verlegt, desto größer wird die Hebelübersetzung, um so größer die Verstärkung. Es ist aber klar, daß trotz der Verstärkung durch die Hebelübersetzung niemals eine völlige Konstanz des Druckes durch diese Regelung erzielt werden kann. Ein kleiner Überdruck muß bestehen bleiben, nur dann bleibt der rechte Quecksilbermeniskus etwas höher und damit der Schieber tiefer. Auch bei größter Verstärkung muß immer noch ein restlicher Überdruck bestehen bleiben. Wäre das nicht der Fall, dann würde der Schieber — das Stellglied — in seine Ruhestellung zurückgehen, die der Nullstellung des Manometers entspricht, und die

Zustromdrosselung wäre damit zu Ende — und damit wäre auch keine Druckregelung mehr vorhanden. Bei völligem Druckausgleich würde ein derartiger Regler die Voraussetzung für seine eigene Funktion beseitigen. Was in diesem einfachen Schema dem restlich bestehenbleibenden Überdruck entspricht, möchte ich für biologische Regelung als den *Restreiz* bezeichnen, der trotz der Verstärkung bestehen bleiben muß, damit die ganze Regelung überhaupt funktioniert und die neue Gleichgewichtslage aufrechterhalten bleibt. Daß ein Restreiz bestehenbleibt, dessen Bestand die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der neuen Gleichgewichtslage zwischen Organismus und Umwelt bildet, wurde für die Optomotorik der Fliegen von H. Mittelstaedt experimentell bewiesen. Um ein anschauliches Beispiel zu bringen: wenn die Netzhautbeleuchtung einen bestimmten konstanten Wert hat und es wird die Intensität des auf das Auge fallenden Lichtes vergrößert, so wirkt diese Intensitätszunahme auf den Beleuchtungsregler der Netzhaut — dessen Fühler die Netzhaut ist — als Störkraft. Die Gegenmaßnahme, die vom Fühler des Reglers über das kräftebeherrschende Zentrum der pupillomotorischen Nervenkerne erfolgt, ist eine Verkleinerung der Pupille durch Betätigung des Stellmotors dieses Reglers, der Irismuskulatur. Würde die Pupillenverengerung bei dieser Beleuchtungsregulierung so weit gehen, daß wieder die alte Netzhautbeleuchtung wie vor der Intensitätserhöhung des Lichtes, also vor Einwirken der Störkraft resultiert, dann würde der Reiz, der die Pupille verkleinert hat und in diesem verkleinerten Zustand erhält, gänzlich wegfallen. Bei 100%iger Kompensation wäre keine Ursache mehr vorhanden, daß die Pupille weiterhin klein bleibt. Bei 100%iger Kompensation der Störkraftwirkung müßte diese durch Wegfall des Reizes sofort wieder größer werden, der Reiz würde dann neuerdings wirken und nun müßte sie wieder kleiner werden usw., d. h. die Pupillenweite müßte fortgesetzt hin- und herpendeln. Bei völliger Selbstausschaltung des Reizes durch den Regler könnte keine Stabilisierung durch solchen Halteregler erreicht werden und das System wäre instabil. Was für die Optomotorik bewiesen und was für die Pupille höchst wahrscheinlich gilt, dürfte auch für die meisten Regelvorgänge im Organismus seine Gültigkeit haben. Wenn z. B. bei Sauerstoffmangel-Atmung ein Zellteilungsreiz auf das rote Knochenmark ausgeübt wird, derart, daß neue Erythrocyten gebildet werden und so durch Vermehrung der O_2-Transportorgane die Sauerstoffnot des Gewebes und des Fühlers in diesem Regler, dem roten Knochenmark, wieder beseitigt wird, so kann auch hier die Beseitigung dieses Sauerstoffmangelreizes wahrscheinlich keine 100%ige sein. Ein kleines Defizit in der O_2-Versorgung muß bestehen bleiben, damit jener Reiz auf das rote Knochenmark weiter bestehen bleibt, der fortgesetzt eine Mehrproduktion roter Blutkörperchen veranlaßt, was die Voraussetzung dafür ist, daß die Zahl der Erythrocyten

während des Sauerstoffmangels erhöht bleibt. Erst nach Aufhören der Sauerstoffmangelatmung, nach Beendigung der Störkraftwirkung auf diesen Regler fällt die Erythrocytenzahl wieder herunter. Durch den vorher bestehen gebliebenen Restreiz wurde während der O_2-Mangelatmung die Erythrocytenzahl auf ihrer Höhe gehalten.

Auch für die Vorgänge bei der Thermoregulierung. dürfte das Bestehenbleiben eines Restreizes von maßgeblicher Bedeutung sein. R. Thauer hat aus seinen Versuchen den Schluß gezogen, daß eine verschiedene absolute Temperatur der Temperatur-Fühlorgane Voraussetzung für die Konstanterhaltung der Körpertemperatur bei verschiedenen Umweltsbedingungen sein muß. Jeder Meßgröße des Fühlers ist also eine ganz bestimmte Stellung der Stellglieder in diesem Regler zuzuordnen. Es müßte sich demnach um einen Regler mit Stellungszuordnung im Sinne des Technikers handeln, wie er vorher im Schema für einen einfachen Druckregler gezeigt wurde. Jeder Stellung des Fühlers entsprach dort eine zwangsläufig zugeordnete Stellung des Stellgliedes. Bei solchem Regler muß ein Restreiz bestehen bleiben, wie ihn Thauer tatsächlich beobachtet hat, wenn er feststellte, daß „geringe Abweichungen der Bluttemperatur" von der Norm „offenbar Voraussetzung des Funktionierens und nicht Folge des Nichtfunktionierens der Temperaturregulation" sind. Würde der Temperaturregler die kleine Differenz, die im Blute nach der Regelung (gegenüber der Norm) noch bestehen bleibt, beseitigen, dann müßte die ganze Regelung zusammenbrechen, denn der Regler würde die Voraussetzung für sein eigenes Funktionieren beseitigen. Nebenbei sieht man besonders bei der Temperaturregelung ein, daß mit einer Differentialquotientenempfindlichkeit der Fühler allein nicht geregelt werden kann, sondern daß stets die absolute Abweichung des Istwertes vom Sollwert zur Regelung mitbenützt werden muß. Vom Standpunkt der Regelmechanismen aus betrachtet ist die alte Webersche Theorie deshalb nicht haltbar, wie Thauer dies auf Grund seiner Deduktionen als erster bereits erkannt hat. Wo die Differentialquotientenempfindlichkeit von Fühlern (so wie wahrscheinlich bei der Temperaturregelung) außer der absoluten Abweichung des Istwertes vom Sollwert zur Regelung mitbenützt wird, kann manchmal (was sich für technische Regler von Fall zu Fall in mathematischer Beweisführung zeigen läßt) eine höhere dynamische Stabilität des Reglers erreicht werden. Vor allem haben solche Regler dann die Eigenschaft gewonnen, daß sie sich besonders den Anfängen einer Störung schnell widersetzen, jedenfalls viel schneller, als wenn die Fühler nicht differentialquotientenempfindlich sind. Um dieses scheint es sich beim Temperaturregler vor allem zu handeln, wenn Teile seines Fühlersystems mit einer Empfindlichkeit für Temperaturänderungen nach der Zeit ausgestattet sind. Am eindrucksvollsten wirkt der Bestand eines Restreizes

wohl beim Atemapparat, der sich als ein Halteregler betrachten läßt mit der Tendenz, in bekannter Weise die Gasspannung im Blute und damit in den Geweben möglichst konstant zu halten. In der Dyspnoe z. B. besteht trotz des vermehrten Luftwechsels der Restreiz einer erhöhten CO_2-Spannung weiter, da sonst die Dyspnoe nicht bestehen bleiben würde. Wäre bei der Eupnoe der Restreiz vollkommen beseitigt, dann würde die Atmung stillstehen und Apnoe eintreten, wie solche vorübergehend bei Hyperventilation durch Beseitigung des Kohlensäure-Restreizes tatsächlich eintritt. Sofern — was wahrscheinlich ist — diese biologischen Hälteregler Regler mit Stellungszuordnung im Sinne des Technikers sind und die Wirkung einer Störkraft nicht 100%ig beseitigen können, sondern ein Restreiz bestehen bleiben muß, müssen auch diese biologischen Regler einen Verstärkermechanismus haben. Der Gesamtreiz dividiert durch den bestehenbleibenden Restreiz entspricht der Verstärkung in solchem System. Je größer die Verstärkung, desto näher kann der Regler den Istwert einer von ihm geregelten Zustandsgröße an den Sollwert dieser Zustandsgröße heranführen. Für die Optomotorik der Insekten, wobei das Auge dem bewegten Objekt so schnell nachläuft, daß die Relativgeschwindigkeit zwischen Auge und Objekt möglichst klein wird, sind Verstärkungsgrade von 1:1000 für kleine Objektgeschwindigkeiten beobachtet worden, d. h. die Wirkung des Reizes wird bis auf 1 Promille durch solchen Regler der Optomotorik beseitigt. Würden diese physiologischen Regler des Pupillenspiels, der Optomotorik, der Thermoregulation, der Atmung, der Blutzuckerregulierung usw. die Wirkung von Störkräften völlig beseitigen können, dann würden sie damit die Voraussetzung ihrer eigenen Funktion beseitigen. Soweit aber solche biologische Regler die Voraussetzung für den Ablauf der Lebensvorgänge sind, ist in konsequenter Weiterverfolgung dieser Gedankengänge zu sagen: ohne daß die Lebensvorgänge von der Umwelt her dauernd in ihrem Ablauf gestört würden, gäbe es kein Leben. Leben heißt fortgesetzt gestört werden.

Fast alle Beobachtungen, die in Biologie und Physiologie vorliegen, sprechen dafür, daß es sich bei den biologischen Reglern um proportional wirkende Regler, also solche mit Stellungszuordnung handelt und daß die Stellgröße, welche nötig ist, um der Störung entgegenzuwirken, mit der Ausgangsgröße des Meßwerkes durch einen Empfindlichkeitsfaktor verbunden ist. Es ist nicht jede Lage dieser biologischen Systeme eine Gleichgewichtslage, sondern es sind rückstellende Direktionskräfte vorhanden, wenn ein irritables Gebilde durch eine Störung (im Sinne der Regelung) bzw. durch einen Reiz (im Sinne der Reflexlehre) aus seiner Ruhelage herausgebracht wurde. Ob darüber hinaus für das Lebensgeschehen auch sogenannte astatische Regler eine Rolle spielen, wobei die Stellung des in Anwendung gebrachten Stellgliedes nicht so wie bei

den bisher besprochenen Systemen der Regelgröße proportional, sondern dem Zeitintegral über die Regelgröße entspricht, möge vorerst dahingestellt bleiben. Nur bei solchen integral wirkenden Reglern (die der Techniker als I-Regler bezeichnet) wäre das Bestehenbleiben eines Restreizes zur Aufrechterhaltung einer neuen Gleichgewichtslage nicht notwendig. Im übrigen lassen sich P-Regler, also solche mit Stellungszuordnung, wie sie nach dem früher Gesagten wahrscheinlich in lebenden Systemen verwendet sind, derart modifizieren, daß sie die Eigenschaften von integral wirkenden Reglern annehmen. Nach den bisher vorliegenden Versuchsergebnissen auf den verschiedensten Gebieten der Biologie scheint es aber so, als ob die lebende Natur hauptsächlich mit P-Reglern arbeiten würde, welche zur Aufrechterhaltung einer neuen Gleichgewichtslage einen Restreiz nötig haben und welche einen Verstärkermechanismus derart besitzen, daß der kleine Restreiz, der bestehen bleibt, die neue Gleichgewichtslage aufrechterhalten kann.

Noch ein anderer Gesichtspunkt ist bei vielen, wahrscheinlich bei allen biologischen Reglern zu beobachten. Während der Techniker meistens in der Lage ist, eine Zustandsgröße stetig zu regeln und die Verstellung der Regelgröße in unendlich kleinen Stufen vornehmen kann, kann solches für biologische Regler nicht zutreffen. Es muß sich bei den biologischen Reglern um Vorgänge einer unstetigen Regelung handeln, d. h. die Zustandsgrößen, die verstellt werden müssen, werden nicht kontinuierlich verstellt, sondern stufenweise — mögen diese Stufen noch so klein sein. Daß dem so sein muß, ergibt sich aus der Gültigkeit des Alles- oder Nichtsgesetzes für die kleinsten, zur Regelung von Zustandsgrößen benützten lebensfähigen Einheiten. Angenommen, es muß die Kraft eines Skeletmuskels auf eine bestimmte Größe eingeregelt werden, z. B. derart, daß sie einer aus der Umwelt auf den Muskel wirkenden Kraft das Gleichgewicht hält, dann ist dies nur dadurch möglich, daß die Anzahl der auf dem größten Querschnitt dieses Muskels tätigen Muskelfasern beherrscht wird. Bei Zunahme der Kraft wird eine größere, bei Abnahme der Kraft eine kleinere Zahl von Muskelfasern in Tätigkeit versetzt werden müssen, die mit ihren Einzelkräften im gleichen Querschnitt parallel geschaltet sind und zusammen die Gesamtkraft des Muskels ausmachen. Eine Variabilität des Zusammenspiels hintereinandergeschalteter, also in verschiedenen Querschnitten, aber im gleichen Längsschnitt des Muskels gelegener Einzelfasern würde aus mechanischen Gründen nicht die Voraussetzung geben, um die Kraft des Gesamtmuskels veränderlich zu gestalten. Die Anpassung der Muskelkraft an die Kräfte der Umwelt kann also nur durch Zu- oder Abschaltung einzelner Motoneuronen im gleichen Querschnitt erfolgen. Die Gültigkeit des Alles- oder Nichtsgesetzes für das einzelne Motoneuron bzw. für die Entladung der einzelnen Muskelfaser macht aber eine stetige Verstellung

der Muskelkraft unmöglich und erzwingt eine stufenweise Verstellung. Die kleinste Größe der Kraftzunahme bei solcher Verstellung hängt von der Größe jenes Kraftzuwachses ab, wie er sich bei der Entladung eines einzelnen neu hinzukommenden Motoneurons ergibt.

Die Gesamtenergie, welche bei Willkürbewegung eines Muskels in diesem frei wird, stellt sich demnach als die Summe einzelner kleiner Energiequantitäten dar, wie sie bei der Entladung der einzelnen Motoneurone freigesetzt werden. Es ist bemerkenswert, daß auch bei den Lebensvorgängen in einem Kollektiv von Zellen freigesetzte Energie nicht in beliebig kleiner Menge freigesetzt werden kann, sondern daß man nach unten auf einen Grenzwert stößt, der wegen Gültigkeit des Alles- oder Nichtsgesetzes für kleinste lebende Einheiten nicht unterschritten werden kann. Alle im Muskel freiwerdende Energie muß also ein ganzes Vielfaches jener vom Nervenmuskelelement freigesetzten Energie sein. Der Zusammenschluß lebender Einheiten zum Kollektiv gewinnt unter diesem Gesichtspunkt eine besondere Bedeutung. Das Kollektiv kann sich von dem Zwang, den das Alles- oder Nichtsgesetz dem Einzelelement auferlegt, dadurch unabhängig und frei machen, daß es das räumliche und zeitliche Zusammenspiel der Einzelentladungen beherrschen lernt und so eine Abstufbarkeit der Leistung im Sinne einer sehr angenähert stetigen Regelung von Lebensvorgängen möglich macht, die ohne solchen Zusammenschluß zum Kollektiv keinesfalls möglich wäre. Auch bei Regelungen des Technikers kann man zwischen stetigen und unstetigen Reglern unterscheiden. Unstetige Regler können solche mit „stufenweise“ wirkenden Gliedern sein, oder solche, bei denen die Glieder „schrittweise“ wirken. Bei stufenweise wirkenden Reglern kann die Ausgangsgröße nur bestimmte abgestufte Werte einnehmen, während bei schrittweise wirkenden Reglern die Ausgangsgröße nur in festgelegten Zeitspannen ihren Wert zu ändern vermag. In der Technik werden unstetige Regler meist verwendet, wenn der Bau technisch möglichst einfach sein soll. Die stufenweise und schrittweise funktionierenden Regler sind sozusagen die primitivere Form einer Regelung im Vergleich zum stetig funktionierenden Regler. Im Grenzfall besteht die ganze Regelung aus einer einzigen Stufe und das kräftebeherrschende Zentrum ist nur mehr eine Stelle, welche die Kraft entweder ein- oder ausschaltet. Es handelt sich dann um einen sogenannten Auf-Zu-Regler. Das Motoneuron als Einzelwesen betrachtet ist nicht mehr als ein einfacher Auf-Zu-Regler der Muskelkraft, da es dem Alles- oder Nichtsgesetz unterworfen ist. Bei großer Stufenzahl oder Schrittzahl innerhalb des Bereiches, in dem geregelt werden soll, nähert sich der unstetige Regler immer mehr dem stetigen Regler, und er hat ihn in jenem Grenzfall völlig erreicht, wo die Stufen bzw. die Schritte unendlich klein geworden sind. Es ist also festzustellen, daß auch ein biologischer Regler, wie er

z. B. der Kräfteeinstellung und Bewegungsregelung unserer Skeletmuskeln dient, im letzten kein stetiger, sondern ein unstetiger Regler sein muß. Für grobe Verstellungen der Muskelkraft ist dies praktisch belanglos. Wenn die Verstellungen aber klein sind, z. B. bei feinsten motorischen Verrichtungen — dann müssen sich Abweichungen vom Verhalten eines stetigen Reglers zeigen. Regeltechnisch betrachtet wirkt sich dies meist derart aus, daß bei kleinen Ausschlägen eine Dauerschwingung gleichbleibender Amplitude in Erscheinung tritt, was beim willkürlich innervierten Muskel einem Tremor entsprechen würde. Daß bei geringgradigen Verstellungen der Muskelkraft oft ein Tremor auftritt, ist bekannt und man kann schon bei der langsamen Fingerbewegung sehen, daß die Verstellung nicht kontinuierlich, sondern stufenweise erfolgt, so wie dies seinerzeit K. Wachholder genauer analysiert hat. Die Natur hat den Zustand einer stetigen Regelung z. B. bei der Willkürbewegung um so mehr angestrebt und in umso größerer Annäherung erreicht, je feiner die Bewegung sein soll, die geregelt werden muß. Bei grob funktionierenden Muskeln, etwa den Glutaei, beherrscht ein Neuron ungefähr 80 Muskelfasern, für die Augenmuskeln wird angegeben, daß auf eine motorische Nervenfaser nur 2—3 Muskelfasern kommen. Schon Rollett hat seinerzeit hier in Graz darauf hingewiesen, daß dies mit der Abstufbarkeit der Muskelleistung zusammenhängt. Betrachtet man die Einstellung der Muskelkraft unter dem Gesichtspunkt der Regelung, dann sind die Glutaei Stellglieder eines Kraftreglers, der nur in großen Stufen, die Augenmuskeln Stellmotor eines Reglers, der in kleinsten Stufen die Regelgröße verändern kann. Aber eine diskontinuierlich stufenweise Regelung besteht für beide, weil für die einzelne Muskelfaser das Alles- oder Nichtsgesetz gilt und deshalb eine stetige Regelung von vornherein gar nicht möglich ist.

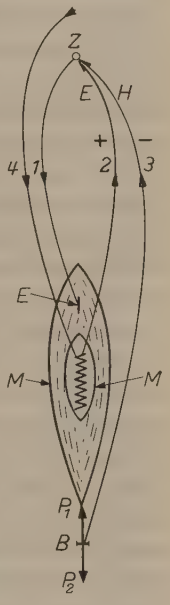


Abb. 4

Daß für die Angleichung der Kraft eines Skeletmuskels an die Kräfte der Umwelt wahrscheinlich wiederum ein in sich geschlossener Regelkreis vorliegt, möge die Abb. 4 verdeutlichen.

Wenn z. B. Kräfte der Umwelt an dem Muskel zerren, dann werden durch Dehnung des Muskels und Mitdehnung seiner Muskelspindeln afferente Impulse den Motoneuronen zugeleitet, welche diese stimulieren und zur Tätigkeit anfachen. Diese Vorderhornganglienzellen schicken ihrerseits efferente Impulse in den Muskel hinaus, welche Muskelfasern in ihm zur Entladung und Kraftentfaltung bringen. Solange die Dehnung des Muskels durch Umwelteinflüsse weitergeht, solange also die Umweltkräfte

größer sind als die Muskelkraft, werden durch die Muskelspindeln, die auf Dehnung mit Erregung reagieren, dauernd weitere Motoneurone im Sinne eines recruitment nach Sherrington mobilisiert und es wird die Kraft des Muskels zunehmen. Das ganze ist ein Eigenreflex, über dessen Ablauf wir durch die grundlegenden Arbeiten Paul Hoffmanns eingehend unterrichtet sind. Vom Standpunkt der Kraft*regelung* aus betrachtet geschieht aber durch die Rückwirkung des Systems auf sich selbst, durch die elastische Rückkoppelung der Vorderhornganglienzellen in der Peripherie noch ein weiteres. Je größer die reflektorisch erzeugte Muskelkraft wird, desto weniger werden die Kräfte der Umwelt den Muskel weiterhin dehnen. Hierdurch wird auch der Längenzuwachs der Muskelspindeln und damit der adäquate Reiz auf diese wieder kleiner, die afferenten Impulse werden schwächer und es werden immer weniger Motoneuronen zusätzlich mobilisiert. Außerdem zieht der Muskel an seiner eigenen Sehne. Die Sehne ist als elastisches Zwischenstück zwischen die Muskelkraft und die Kräfte der Umwelt eingeschaltet. In ihr befinden sich die Golgi-Organe, deren adäquater Reiz Spannungsänderungen sind. Die Afferenzen aus ihnen wirken auf die Motoneuronen hemmend, wie Mc. Couch nachgewiesen hat. Am Beginn der Muskeldehnung durch Umweltskräfte sind die Längenänderungen der Muskelspindeln (welche Motoneuronen mobilisieren) groß, die Spannungsänderungen in den Golgi-Organen (welche Motoneuronen hemmen) klein. Je weiter die reflektorisch wachgerufene Muskelkraft ansteigt, desto kleiner werden die erregungssteigernden Längenänderungen der Muskelspindeln, der Dilatoreceptoren, und desto größer werden die erregungshemmenden Spannungsänderungen in den Golgi-Organen der Sehne. Der Muskel zieht also mit steigender Kraft immer mehr an seiner eigenen Sehne und stoppt sich damit selbst für einen weiteren Kraftzuwachs um so mehr ab, je näher sich seine Kraft an jene Umweltskraft angenähert hat, die ihn primär gedehnt und die sogenannte „reflektorische" Muskelaktion ausgelöst hat. Auch für die automatische Anpassung der Muskelkräfte an die Kräfte der Umwelt scheint also wiederum ein Regelkreis vorzuliegen, d. h. zwei ineinander geschachtelte Regelkreise, welche die Krafteinstellung unserer Muskeln selbsttätig regeln. Höhere Stellen im Zentralnervensystem werden damit von dieser trivialen Aufgabe, die bei jeder alltäglichen Bewegung erfüllt werden muß (für deren Vorkommen ein hoher Wahrscheinlichkeitsgrad besteht), befreit und auch hier hängt die Freiheit übergeordneter motorischer Zentren von der Funktion eines derartigen untergeordneten Automatismus ab, der die Muskelkraft selbsttätig einregelt. Nur durch solchen selbsttätigen Kraftregler werden Kräfte aus der Umwelt, die sonst den Ablauf der Bewegung stören würden, in ihrer Wirkung herauskompensiert. Das Zentralnervensystem behält damit die Initiative für den Bewegungsablauf und diktiert

dadurch bei der Willkürbewegung das „Gesetz des Handelns". Die Regler unserer Skeletmuskelkraft haben also die Aufgabe zu erfüllen, bei unseren Bewegungen die Muskelkraft automatisch an die Umweltskräfte anzupassen und sie bedienen sich hierzu offenkundig eines Organes, welches die Differenz der Kräfte dem Zentralnervensystem durch Afferenzen vermeldet. Die Sehnen sind als kräfteregistrierende Organe zwischen Muskel und Umweltskräfte eingeschaltet. Auch der Techniker baut ähnlich funktionierende Regler, welche die Aufgabe haben, eine bestimmte Größe an eine andere Größe, die sich als Funktion der Zeit ändert, fortlaufend anzupassen. Solche Regler bezeichnet man in der Technik im Gegensatz zu den früher besprochenen Haltereglern (welche eine Zustandsgröße im Ablauf der Zeit konstant halten) als „Nachlauf-Regler" oder „Folge-Regler".

Alle Regelkreise im lebenden Organismus, seien es „Halte"- oder „Folge-Regler", scheinen die übergeordnete Tendenz zu haben, nach einer eingetretenen Störung wieder einen Zustand größtmöglicher Ruhe herbeizuführen, einen Zustand, bei dem ein Minimum des Energieumsatzes im Regelkreis schließlich herrscht. Auch ohne regeltechnische Vorkenntnisse ist dies leicht einzusehen. Wenn eine Störung eine Abweichung vom Sollwert der Regelgröße zur Folge hat, dann kommt das Meßwerk in Gang bzw. es werden Receptoren erregt, die durch ihre Afferenzen nun Efferenzen auslösen, die über das Stellglied unter Gegenkoppelung die Regelgröße in Richtung zur Norm zurückzuführen bestrebt sind. Damit werden weitere Afferenzen wieder schwächer und die Erregung im Kreis geht zurück auf ein Minimum. Die biologischen Regler haben also die Tendenz, jedem Leistungszuwachs entgegenzuwirken, und die Herstellung möglichster Ruhe scheint ihre wichtigste Aufgabe zu sein. Einen Leistungszuwachs völlig zu beseitigen, ist diesen biologischen Regelsystemen wahrscheinlich nicht möglich, weil der früher besprochene Restreiz bestehen bleiben muß, der die Voraussetzung ihrer Funktion ist. So betrachtet, sind die lebenden Organismen Systeme, die ohne Störkräfte aus der Umwelt zur Untätigkeit verurteilt wären, wobei man in konsequenter Fortführung dieser Gedankengänge die hier nicht zu behandelnde Frage offen lassen muß, ob und wieweit selbst der Grundumsatz noch als Ergebnis einer Störung aus der Umwelt aufzufassen ist.

Wenn man demnach eine Fülle von Vorgängen in unserem Organismus als Regelungen im Sinne des Technikers betrachten darf und Atmung, Thermoregulation, Osmoregulation, Einstellung des Blutzuckerspiegels, der Wasserstoffionenkonzentration des Blutdruckes usw. alle gleichzeitig nebeneinander vorhanden sein und ablaufen müssen, um das Zellmilieu konstant zu halten, dann müssen trotz solcher selbsttätiger Regelung verschiedener Größen durch die einzelnen Funktionskreise diese doch untereinander verbunden sein und zusammenspielen.

Sie müssen, wie der Techniker sagt, vermascht und derart aufeinander abgestimmt sein, daß in jedem der einzelnen Regelkreise ein Maximum dynamischer Stabilität besteht. Eine Vermaschung dieser Regelkreise ist in der Peripherie sowieso gegeben, weil sich die physikalischen und chemischen Größen gegenseitig beeinflussen, deren Sollwert von diesen einzelnen Reglern eingestellt wird. Eine zweite Vermaschung muß an zentraler Stelle vorhanden sein, wo die Sollwerte der einzelnen Regelgrößen derart verstellt und aufeinander abgestimmt werden müssen, daß alle die einzelnen selbsttätigen Regelungen für verschiedene Zustandsgrößen im Interesse des Ganzen — also im Interesse der Lebenshaltung — richtig zusammenspielen. Vieles ließe sich als Argument dafür vorbringen, daß man die vegetativen Zentren im Hypothalamus als Orte solcher zentralen Vermaschung der einzelnen Regelkreise anzusehen hat, als Orte, in denen die Sollwertsverstellungen für die einzelnen Regelkreise derart erfolgen, daß alle in ihrem Zusammenspiel aufeinander abgestimmt sind. Die Abstimmung muß also dem Zwecke dienen, daß sich die einzelnen Regelkreise gegenseitig nicht stören und daß für jeden einzelnen von ihnen ein Maximum von dynamischer Stabilität erzielt wird. Wo ein einziger dieser Regelkreise dynamisch instabil wird und versagt, versagen schließlich alle anderen. Dabei muß der Organismus manchmal Kompromisse schließen und es kann — um nur ein Beispiel herauszugreifen — so sein, daß zugunsten der Thermoregulation manchmal Verstellungen im Kreislauf nötig werden, die vorübergehend auf Kosten der Gewebsernährung gehen oder umgekehrt.

Zum Schluß dieser Betrachtung drängt sich noch eine andere Frage auf, wenn man sich mit den Lebensvorgängen vom Standpunkt selbsttätiger Regelung aus befaßt. Greift man irgendeinen Vorgang heraus, der sich als eine Regelung verstehen läßt, wie z. B. den früher erwähnten Mechanismus automatischer Anpassung der Skeletmuskelkraft an die Kräfte der Umwelt, so ist man sich bewußt, daß dieser Regelkreis im komplexen Geschehen bei der Willkürbewegung nur einen sehr subalternen Teilapparat darstellt. Ein solcher Apparat ist ein sehr untergeordneter Mechanismus des Rückenmarks, der seinerseits wieder übergeordneten Korrelationssystemen höherer Abschnitte des Zentralnervensystems untersteht. Nun lassen sich aber nicht nur solche untergeordnete Mechanismen der Willkürmotorik, sondern auch übergeordnete Mechanismen, deren kräfteverstellende Zentren im Großhirn ihren Sitz haben, gleichfalls unter den Aspekten der Regelung verstehen. Man denkt hier z. B. an die automatische Einstellung der Bewegungsgeschwindigkeit, die sich als Regler dem Verständnis näherbringen läßt, wenn man annimmt, daß die Muskelspindeln, die Dilato-Receptoren, als Fühler für die Bewegungsgeschwindigkeit fungieren können. Man denkt hier besonders an die von K. Küpfmüller experimentell bewiesene Tatsache,

daß gezielte Willkürbewegungen, also solche, die unter optischer Kontrolle erfolgen, quantitativ den Gesetzen astatischer Folgeregler gehorchen. Wenn ich z. B. einen Gegenstand unter optischer Kontrolle angreife, so folgt meine Bewegung quantitativ solchem Gesetz. Man muß sich fragen, wo hört die Regelung der Lebensvorgänge nach oben hin auf, wenn selbst das Zusammenspiel von Optik und Motorik Regelung ist? Auch für das Zusammenspiel von Hören und Phonation ließe sich das Walten eines Regelkreises im Sinne einer Selbstkontrolle wahrscheinlich machen. Vermutlich wird alles, was wir tun, von receptiven Apparaten wieder kontrolliert und in jede spätere Befehlsgebung geht das Ergebnis eines früher erfolgten Befehls wieder ein, so wie dies für Regler charakteristisch ist. In stets kontrollierter Anpassung an die Umwelt erfolgen unsere Aktionen und wo dies nicht der Fall ist, etwa beim Schreiben ohne optische Kontrolle, beim Geigenspielen ohne akustische Kontrolle, werden die Fehlleistungen meist sehr schnell offenkundig. Nach oben — in Richtung höchster zentralnervöser Funktionen — läßt sich wahrscheinlich keine Grenze finden, wo Regelung aufhört und wo Steuerung anfängt. Selbst abstrakte Denkvorgänge unterliegen einer Kontrolle, welche man landläufig als „Selbstkritik" bezeichnet und selbst hier scheint es sich (im besten Fall) immer um Regelung zu handeln.

Wo sind der biologischen Regelung Grenzen nach unten gezogen und für welche kleinsten biologischen Einheiten gelten noch die hier skizzierten Zusammenhänge — das sei eine letzte Frage. Wenn man eine einzelne lebende Zelle als kleinste lebensfähige Einheit betrachten darf, muß man annehmen, daß innerhalb solcher noch Regelungen statthaben. Das Bestreben, stationäre Bedingungen für den Stoffwechsel aufrechtzuerhalten, läßt das Funktionieren von Regelmechanismen erwarten. Für Vorgänge der Zellteilung deutet sich die Funktion solcher Einrichtungen bereits an, mit dem Ziel durch die Teilung das Verhältnis Oberfläche zu Volumen zugunsten der Oberfläche zu verändern und die Diffusionswege zu verkleinern, wo sie ohne solche Gegenmaßnahmen zu groß würden. Auch die Vorgänge nutritiver Durchblutungsregelung lassen sich als Regelvorgänge in kleinsten biologischen Einheiten dem Verständnis näherbringen, was ich hier nicht weiter ausführen kann. Nur die Methoden der Signalgebung sind in diesen kleinsten Einheiten andere als im Gesamtorganismus und für Regelung innerhalb kleiner Räume, d. h. also für Regelstrecken kleinster räumlicher Ausdehnung scheint die Diffusion von Stoffen, also eine Signalgebung auf humoralem Wege ausreichend zu sein, um die Laufzeit des Reglers klein genug zu halten, damit die Gegenmaßnahme nach Wirken einer Störkraft nicht zu spät kommt. Wird der Raum, innerhalb dessen eine Zustandsgröße geregelt werden soll, aber größer, dann werden nach Art der Axonreflexe bereits Nerven zur Signalgebung innerhalb des Regelkreises in Anwendung gebracht,

welche größere räumliche Distanzen schnell genug überbrücken, um eine genügend kurze Laufzeit und eine dynamische Stabilität in dieser größeren Regelstrecke zu gewährleisten. Je größer die Regelstrecke wird, desto mehr ist der Organismus auf das Prinzip der Signalgebung durch Nerven angewiesen, damit die Gegenmaßnahmen für die räumlich ausgedehnte Regelstrecke schnell genug erfolgen. Nur für langsame Vorgänge genügt für den Gesamtorganismus eine humorale Signalgebung durch Botenstoffe, um nach einer Störung Gegenmaßnahmen rechtzeitig einzuleiten.

Wenn man zu immer kleineren biologischen Einheiten fortschreitend eine einzelne Zelle betrachtet und zur Annahme kommt, daß diese wahrscheinlich bereits nach Art eines Regelmechanismus organisiert sein dürfte, um in der Lage zu sein, den verschiedenartigen „Störkräften" aus der Umwelt, die man in der Biologie und Physiologie gewöhnlich als „Reize" bezeichnet, durch Gegenwirkung gewachsen zu sein und ihr Dasein zu behaupten, dann ließe sich bereits eine einzelne Nervenzelle mit ihren Fortsätzen, also auch der isolierte Nerv, unter dem Gesichtspunkt eines in sich geschlossenen Regelkreises mit Gegenkoppelung betrachten. Dem Nerven wohnt zweifellos die Eigenschaft inne, Störkräfte in ihrer Wirkung durch Gegenwirkungen herauszukompensieren mit der Tendenz, den Zustand des Ruhestoffwechsels nach der Störung wieder herzustellen. Der schnellste Stromanstieg, der z. B. beim Einschleichen eines elektrischen Stromes in den Nerven gerade noch keine erregende Wirkung hat, würde für die dynamische Stabilität dieses Systems besonders kennzeichnend sein. So betrachtet hat bereits der Nerv die Eigenschaften eines Stoffwechselhaltereglers, der den Sollwert seines Ruhestoffwechsels einzustellen bestrebt ist, wenn eine Störkraft gewirkt hat. Die Tendenz aller biologischen Regelkreise, ein Minimum des Stoffwechsels anzustreben, ist hier schon deutlich. Erregbarkeitsschwankungen, die solches System etwa beim plötzlichen Anlegen eines elektrischen Potentiales oder der plötzlichen Wirkung einer anderen Störkraft erfährt, ließen sich nach dem Vorgehen des Technikers unter dem Gesichtspunkt der „Übergangsfunktion" eines Reglers betrachten und würden für die dynamische Stabilität als „Halteregler" seines Ruhestoffwechsels charakeristisch sein. Wenn man nach unten zu immer kleineren biologischen Einheiten fortschreitet, findet man eine Grenze für biologische Regelungen wahrscheinlich erst bei jenen letzten Feinstrukturen des Gewebebaues, welche die unerläßliche Voraussetzung für Erregbarkeit bilden, jenen Membranen, die allen lebenden Zellen gemeinsam sind. An ihnen dürfte sich erstmals der Vorgang einer „Rückkoppelung" mit „Gegenschaltung" im Sinne von Regelmechanismen abspielen und bei der Entstehung des Lebens abgespielt haben. Die Vorgänge des Kalium-Natrium-Ionenaustausches an jenen Membranen, welche den Zellinhalt von seiner Umwelt

trennen, dürften in ihrer Wechselwirkung mit dem Stoffwechsel bereits dazu führen, daß ein Zustand minimalen Stoffwechsels gegen Störkräfte aus der Umwelt immer wieder hergestellt und aufrechterhalten werden kann — ein Urvorgang des Lebens — über den wir in den nächsten Vorträgen hören werden. Der Erhalt dieses Ruhezustandes und seine Wiederherstellung nach erfolgter Störung durch eine Gegenkoppelung verhindert den Zerfall lebender Substanz und den einfachen Ablauf der Vorgänge nach dem Entropie-Satz. Der Erhalt dieses Zustandes bedeutet aber das Dasein. So kommt man schließlich zur Auffassung, dort, wo der erste Regelmechanismus war, war das erste Leben.

Dem Pharmakolngen könnte es noch besonderes Interesse bieten, Wirkungen der von ihm untersuchten Substanzen, als auf Teilmechanismen biologischer Regelkreise gerichtet zu betrachten und den Einfluß solcher Stoffe auf die dynamische Stabilität jener Regler festzustellen, die er durch Korrekturen zur Gleichgewichtslage ihres Sollwertes zurückführt, wenn Störkräfte aufgetreten sind.

Literatur

Bethe, A.: Allgemeine Physiologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952. — Hoffmann, P.: Erg. Physiol. **36**, 15 (1934). — Holst, E. v.: Verh. Ges. dtsch. Naturforsch. **96**, 1 (1950). — Kupfmüller, K.: Arch. elektr. Übertragungen **7**, 71 (1953). — McLoud, G. P.: Amer. J. Physiol. **71**, 137 (1924). — Maske, H.: Experentia (Basel) XI/**3**, 122 (1955). — Mittelstaedt, H.: Verh. dtsch. Zool. **1951**, 150. — Rollet, H.: Pflügers Arch. **52**, 201 (1892). — Sherrington, L. S., and F. G. T. Lidell: Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B, **93**, 907 (1923). — Stier, A.: Z. Anat. **116**, 399 (1952). — Thauer, R.: 5. Neurovegetation Symposion, Wien 1954. — Wachholder, K.: Erg. Physiol. **26**, 568 (1928). — Wagner, R.: Z. Biol. **83**, 59, 120 (1925). — Wiener, N.: Cybernetics, New York 1948.

R. Stämpfli (Homburg-Saar): Die Ionentheorie des Erregungsvorgangs und ihre möglichen Zusammenhänge mit der Biochemie

Mit 9 Textabbildungen

Die Tatsache, daß mir als Elektrophysiologen durch den Herrn Vorsitzenden Ihrer Gesellschaft der ehrenvolle Auftrag zuteil geworden ist, über die Biochemie des Erregungsvorganges zu sprechen, charakterisiert nach meiner Auffassung in bester Weise die gegenwärtige Situation in der Forschung um die Biochemie der Erregung. Seit der Einführung quantitativer Untersuchungsmethoden an *einzelnen* Nerven- und Muskelfasern vor etwa 15 Jahren hat die elektrophysiologische Forschung in rascher und sehr beachtlicher Entwicklung zur heute allgemein anerkannten Ionentheorie der Erregung geführt. Die Biochemie ist aber bei dieser Entwicklung zum mindesten aus drei Gründen zu kurz gekommen.

Der eine ist, daß die Aufklärung eines chemischen Prozesses, der im besten Fall einige Millisekunden beansprucht, sehr schwierig ist.

Der zweite dürfte sein, daß die Substanzmengen, die während eines Erregungsvorganges an Einzelfasern oder gar an den winzigen Membranstückchen eines Ranvierschen Schnürrings umgesetzt werden, kaum erfaßt werden können.

Und der dritte und wichtigste Grund dürfte sein, daß die Ionentheorie der Erregung den Erregungsvorgang in der Hauptsache zu einem physikalisch-chemischen und nicht zu einem chemischen Problem gemacht hat.

Diese Feststellungen sollen nur dazu dienen, zu begründen weshalb ich Ihnen in der Folge vor allem die Ionentheorie der Erregung vortragen werde. Sie ist letzten Endes erst die Grundlage einer Diskussion über die Frage, ob und wo chemische Prozesse im Erregungsvorgang eingreifen könnten. Als weitere Einschränkung sei mir gestattet, vor allem über den Erregungsvorgang am Nerven zu sprechen, da ich mich mit diesem Gebiet mehr beschäftigt habe.

I. Das Ruhepotential

1. Allgemeines

Bernstein (1902) hat mit seiner Theorie des Ruhepotentials im gesamten Recht behalten. Eine überwältigende Mehrheit der Elektrophysiologen glaubt heute, daß es zur Hauptsache ein Kalium-Diffusionspotential an der erregbaren Membran ist. Die hohe Kaliuminnenkonzentration der Nerven- und Muskelfasern, die Abhängigkeit des Membranpotentials von der Kaliumaußenkonzentration, die (bei höheren Konzentrationen wenigstens) den nach der Nernstschen Formel zu erwartenden Verlauf nimmt, machen dies in hohem Grade wahrscheinlich (Zusammenstellung siehe Hodgkin, 1951). Die Abweichungen des Membranpotentials von der theoretischen Kurve bei geringen Kalium-Konzentrationen werden meist durch die Mitwirkung der Natrium- und Chlorionen erklärt. Für jedes Ion hat die ruhende Membran eine bestimmte Leitfähigkeit, die dem Innenwiderstand der Diffusionsbatterie für das betreffende Ion umgekehrt proportional ist. Die Konzentrationsunterschiede zwischen Axoplasma und Außenmedium sind für K^+, Na^+ und Cl' die größten. Das Membranpotential der ruhenden Nervenfaser muß deshalb die Resultante aus der Parallelschaltung dieser drei Ionenbatterien sein. Der elektrochemische Gradient der Na-Ionenbatterie ist dem der Kalium- und Chlorbatterien entgegengerichtet. Die Na-Leitfähigkeit der ruhenden Membran beträgt aber bei der *Loligo*-Riesenfaser nur etwa 0,01 mmho/cm² Membran im Gegensatz zu 0,5 mmho/cm² für K und etwas weniger für

Cl (Huxley, 1954). Die Na-Batterie kann deshalb in Ruhe höchstens das Membranpotential etwas verkleinern. Es bleibt in der Nähe des theoretisch aus der Konzentrationsdifferenz zwischen Axoplasma und Außenmedium zu berechnenden Diffusionspotentials für Kaliumionen. Der Parallelschluß einer leistungsfähigen Kaliumbatterie mit einer Na-Batterie umgekehrten Vorzeichens und geringer Leitfähigkeit bewirkt einen ständigen schwachen Stromfluß, der die Tendenz hat, beide Batterien zu entladen und die Konzentrationsgradienten, welche die Diffusion veranlassen, auszugleichen. Geringe Kaliummengen müssen infolge dieses Stroms ständig die Nervenfaser verlassen und durch Na aus der Na-Batterie ersetzt werden. Trotz dieses Ausgleichsstroms behalten die Nervenfasern in vivo und auch überlebende Fasern über längere Zeit ihre hohe Kaliumkonzentration im Axoplasma, falls ihr Stoffwechsel nicht behindert wird. Bevor wir überhaupt von der Erregung sprechen, stoßen wir also schon auf einen Vorgang mit wichtigen biochemischen Grundlagen: Trotz einer deutlichen Durchlässigkeit der Nervenmembran für Natrium und Kalium werden die Konzentrationsunterschiede zwischen Axoplasma und Außenflüssigkeit durch einen Stoffwechselmechanismus aufrecht erhalten.

2. Die Natriumpumpe

Dean (1941) hatte erstmals angeregt, daß im Muskel, für dessen ruhende Membran ähnliche Bedingungen gelten, der Stoffwechsel die eingedrungenen Natriumionen ständig wieder hinausschaffe. Die Versuche von Keynes (1951) mit radioaktiven Isotopen haben bewiesen, daß Na^+ ständig in beträchtlicher Menge aus der einzelnen Riesenfaser des Cephalopoden *Sepia officinalis* ausströmt, obschon diese Strömungsrichtung dem elektrochemischen Gradienten des Natriums entgegenläuft. Ähnliche Befunde sind von Harris u. Burn (1949), Keynes (1949) u. a. am Muskel erhoben worden. Der Na-Ausstrom beträgt bei der Sepia-Riesenfaser ungefähr 3×10^{-5} Mol/g Axoplasma/Std gegen eine Potentialdifferenz von etwa 115 mV. Diese Konzentrationsarbeit würde etwa 0,08 cal/g beanspruchen, was etwa 10% des Ruhestoffwechsels der Fasern ausmacht. Diese Feststellung deckt sich mit neueren Untersuchungen am Muskel (Keynes u. Maisel, 1954).

Ussing (1949) hat gestützt auf theoretische Erwägungen und experimentelle Vergleiche an der Froschhaut das Verhältnis des Ioneneinstroms M_i zum Ionenausstrom M_a für ein monovalentes Kation bei unabhängiger, freier Diffusion durch eine geladene Membran mathematisch formuliert. Teorell war im gleichen Jahr unabhängig von Ussing zur gleichen Formulierung gelangt, die inzwischen bei der Beurteilung des aktiven Ionentransportes große Bedeutung erlangt hat.

Eine häufig gebrauchte Schreibweise der Formel lautet:

$$\frac{M_i}{M_a} = \frac{f_a}{f_i} \frac{C_a}{C_i} e^{EF/RT} \quad (1)$$

wobei f_a und f_i Aktivitätskoeffizienten, C_a und C_i die Konzentration des betreffenden Ions außen und innen und E das Membranpotential bedeuten. Bei Anwendung dieser Formel für Na an Sepianerven, wo die Na-Innen- und Außenkonzentration und das Ruhepotential bekannt

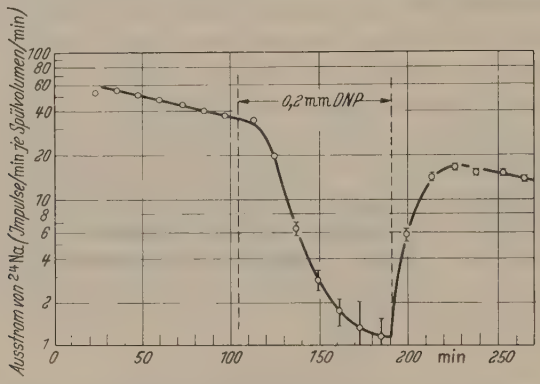


Abb. 1. Veränderung des Na^+-Ausstroms bei Behandlung einer Riesen-Nervenfaser von *Sepia officinalis* mit Dinitrophenol. Abszisse: Zeit nach Ende der Reizung in ^{24}Na Meerwasser. Ordinate: Pro Zeiteinheit aus der Faser austretende Menge von ^{24}Na. Temperatur 18° C. (Hodgkin u. Keynes, 1953)

sind, ergibt sich unter Annahme gleicher Aktivitätskoeffizienten in Axoplasma und Außenlösung

$$\frac{M_i}{M_a} = \frac{200 \text{ bis } 50}{1}.$$

Die Messungen mit dem Isotop ^{24}Na geben ungefähr ein Verhältnis des Na-Einstroms zum Na-Ausstrom von 1:1. Der Na-Ausstrom aus der Sepia-Nervenfaser ist also 50—200mal größer, als er auf Grund freier Diffusion sein dürfte (Hodgkin & Keynes, 1955b). Die heute von Hodgkin u. Keynes (1955a) gegebenen Daten über die Hemmbarkeit des Na-Ausstroms durch Fermentblocker und durch Kälte bestätigen die Annahme, daß es sich dabei um einen aktiven Pumpmechanismus unter Verwendung von Stoffwechselenergie handelt. Dinitrophenollösungen in einer Konzentration von 0,2 mM (s. Abb. 1), 1 mM NaCN und 3 mM NaN_3 hemmen den Ausstrom von ^{24}Na in 1½—2¼ Std fast vollständig und reversibel. Auch Kälte hat eine ähnliche, aber sofort einsetzende Wirkung (Abb. 2). Analog zu den Befunden von Hodgkin & Katz (1949) über die Abhängigkeit der Repolarisationsphase des Aktionspotentials von *Loligo*-Fasern besteht aber auch für den Na-Aus-

strom keine lineare Abhängigkeit von der Temperatur, sondern die größte Temperatureinwirkung wird in der Nähe von 0° C beobachtet, wo Q_{10} wesentlich größer als 3 ist. Obschon diese Analogie auf einem Zufall beruhen kann, scheint sie doch im Hinblick auf mögliche Beziehungen der Na-Pumpe zum Erregungsvorgang beachtlich.

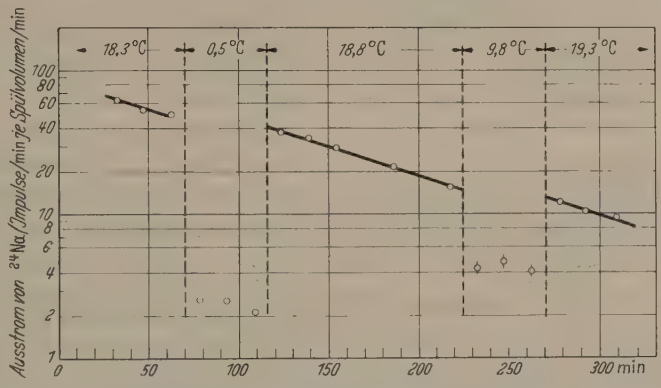


Abb. 2. Die Wirkung der Temperatur auf den Na^+-Ausstrom aus *Sepia*-Riesen-Nervenfasern. Einzelheiten wie in Abb. 3. (HODGKIN u. KEYNES, 1955a)

3. Die Kaliumpumpe

Ähnlich dem Na-Ausstrom findet man einen K-Einstrom entgegen dem Konzentrationsgradienten für Kalium in Krabben- und Cephalopoden-Nervenfasern (SHANES, 1951; HODGKIN & KEYNES, 1954). Auch er ist durch die vorher erwähnten Konzentrationen von Fermentblockern hemmbar und es gilt hier, wie übrigens für den Na-Ausstrom ebenfalls die Feststellung, daß es sich nicht einfach um eine Abnahme der Ionendurchlässigkeit in beiden Richtungen handelt, da der K-Ausstrom bzw. Na-Einstrom von den Blockern nicht wesentlich verändert wird. Der durch DNP vergiftbare K-Einstrom ist am ausgeprägtesten bei Nervenfasern, die sich von einer vorausgegangenen längeren Reizperiode erholen. Als Nachwirkung des Erregungsvorgangs bleibt offenbar über längere Zeit noch eine verstärkte Tätigkeit der aktiven K-Aufnahme durch die Faser bestehen. Der Temperaturkoeffizient Q_{10} beträgt 3,3 im Gegensatz zu dem des K-Ausstroms und des Na-Einstroms bei ruhenden Fasern, der nur wenig größer als 1 ist. Normalerweise, bei geringen K-Außenkonzentrationen ist der passive, nicht durch Fermentblocker hemmbare Anteil des K-Einstroms gering. Erst bei Erhöhung der K-Außenkonzentration, die zu einer Permeabilitätszunahme für K in beiden Richtungen führt, sinkt der Anteil aktiv transportierter Kaliumionen und die Ein- und Ausströme werden annähernd gleich und sind wenig durch Temperaturänderungen beeinflußbar.

4. Gegenseitige Abhängigkeit der Kaliumionenströme voneinander

Die Formel (1) läßt sich nach Hodgkin u. Huxley (1952b) auch folgendermaßen schreiben:

$$\frac{M_i}{M_a} = \exp.\,(E - E_K)F/RT \qquad (2)$$

wobei E das tatsächliche Membranpotential und E_K das Gleichgewichtspotential für Kalium

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_i}{[K]_a}$$

darstellen, wenn $[K_i]$ und $[K_a]$ die Kalium-Innen- und Außenkonzentrationen bedeuten. Hodgkin u. Keynes (1955b) prüften M_i und M_a in einer Versuchsanordnung, wo sowohl $[K]_a$ wie auch E durch Polarisation oder Depolarisation geändert werden konnten. Es zeigte sich, daß je nach der Größe der treibenden Kraft $(E - E_K)$ das Verhältnis $\frac{M_i}{M_a}$ sich erheblich änderte. Der K-Ausstrom nahm bei abnehmendem E stark, der K-Einstrom um viel weniger zu. Dieser Befund bestätigt, daß durch eine Depolarisation die Membranleitfähigkeit für K erhöht wird. Eine Gleichheit des Kalium-Ein- und Ausstroms nach (2) muß dann auftreten, wenn $E = E_K$ ist. Dies konnten Hodgkin u. Keynes (1955b) tatsächlich bestätigen. Sobald aber das Membranpotential über oder unter dieses Gleichgewichtspotential sinkt, ändert sich das Verhältnis des K-Einstroms zum K-Ausstrom nicht in der durch (2) geforderten Weise. Das Unabhängigkeitsprinzip zwischen den beiden Ionenströmen gilt also nicht. Wird ein *Sepia*-Axon von seinem normalen Ruhepotential z. B. um etwa 30 mV depolarisiert, so bewirkt eine Veränderung von $[K]_a$ um das 10fache (von 10,4 auf 104 mM K) eine Abnahme von M_a um das 2,6fache und eine Zunahme von M_i um etwa 30. Bei Unabhängigkeit der Ionenströme voneinander und gleichbleibendem Potential E müßte aber M_a gleich bleiben und nur M_i proportional zur Außenkonzentrationszunahme ansteigen. Statt dessen sinkt M_a ab und steigt M_i verhältnismäßig zu stark an. Die beiden Ionenströme sind also voneinander abhängig. Je größer der K-Ionen-Einstrom ist, um so schwieriger wird es für die K-Ionen im Innern auf Grund freier Diffusion in der Richtung des elektrochemischen Gradienten für K^+ auszuströmen. Je kleiner andererseits das dem Ausstrom entgegenwirkende Membranpotential E gemacht wird, desto stärker wird der Ioneneinstrom M_i von den ausströmenden K-Ionen gebremst. Diese gegenseitige Abhängigkeit bedarf einer Erklärung. Auf Grund von einfachen Modellversuchen haben Hodgkin u. Keynes (1955b) einen Membranmechanismus genauer diskutiert, der ein solches Verhalten erklären könnte (Abb. 3). Zwei flache Behälter, die durch eine Öffnung miteinander verbunden

sind, können für kurze, genau definierte Zeiten durch eine mechanische Schüttelvorrichtung, welche die Rolle der BROWNschen Bewegung übernimmt, geschüttelt werden. Zu Beginn des Versuches enthält Behälter I 100 blaue, Behälter II 50 weiße Stahlkugeln. Nach 15 sec zählt man die Anzahl der blauen Kugeln in II und der weißen in I. Das Resultat entspricht den Erwartungen: Rund 2mal mehr blaue Kugeln hatten in I die Wahrscheinlichkeit das Loch zu treffen und nach II hinüberzukommen als weiße nach I kommen konnten. Wird nun statt eines einfachen Lochs ein Kanal genommen, in dem drei Kugeln hintereinander Platz haben, so findet man in II 18mal mehr blaue Kugeln als weiße in I. Die Zahl der aufeinanderfolgenden Stöße, die notwendig ist, um eine Kugel von I nach II oder umgekehrt zu befördern, ist 4. (Ein Netto-Übertritt findet nur statt, wenn gleichartige Kugeln hintereinander den Kanal ausfüllen und ein zusätzlicher Stoß die ersteingetretene ins andere Gefäß befördert.) Die Wahrscheinlichkeit für dieses Ereignis ist auf der Seite der um den Faktor 2 vermehrten blauen Kugeln $2^4 = 16$mal größer als bei den weißen. Das Resultat der Messung bestätigt also diese Annahme.

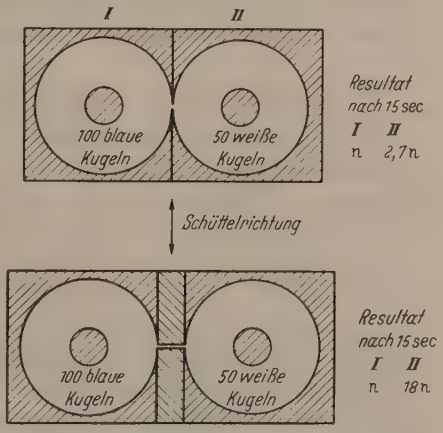


Abb. 3. Das Modell von HODGKIN und KEYNES (1955b) zur Erklärung der Abhängigkeit der K^+-Ein- und Ausströme voneinander. Einzelheiten im Text. — Nach 15 sec Schütteln (Ersatz für die BROWNsche Bewegung) sind bei Poren von etwas mehr als Kugeldurchmesser aber sehr viel kleinerer Länge n weiße Kugeln nach I und 2,7 n blaue Kugeln nach II übergetreten, wie aus dem Konzentrationsverhältnis von 2/1 = 2 zu erwarten war. Werden die Poren aber länger als der Kugeldurchmesser, so daß n Kugeln hintereinander darin Platz haben, so treten 2^{n+1} mehr Kugeln von der hohen zur niedrigen Teilchenzahl über als umgekehrt. Der Durchtritt der Teilchen in einer Reihe verstärkt also den Teilchenfluß in der Richtung des Konzentrationsgefälles im Verhältnis zum Teilchenfluß in umgekehrter Richtung

Diese Übereinstimmung zwischen Modellversuch und Experiment darf nicht als Beweis dafür angesehen werden, daß die erregbare Membran tatsächlich Poren besitzt. Sie führt aber zur grundsätzlich wichtigen Vorstellung, daß K-Ionen nicht einzeln, sondern hintereinander in einer Reihe durch die Membran hindurchtreten. Dabei kann man sich vorstellen, daß beim normalen, relativ hohen Membranpotential Ketten mit negativen Ladungen, die ähnlich Kationenaustauscherharzen gebaut sein könnten, stark an die Membran-Außenseite gedrängt werden, und daß diese Situation eine relativ ungünstige Aussicht für die K-Übertragung ins Innere oder von innen nach außen bietet. Würde das Membranpotential erniedrigt, könnten sich die Ketten in der Membran gleichmäßiger

verteilen und damit eine besser gangbare Brücke für den Ionenaustausch in der einen oder anderen Richtung bieten. Da mehrere Ladungen hintereinander lägen, könnte Kalium nur entsprechend dem erwähnten Mechanismus in einer Reihe von aufeinanderfolgenden Ionen durchtreten. Dementsprechend müßte durch eine Erhöhung des Durchstroms in einer Richtung, z. B. durch Konzentrationserhöhung oder durch Verminderung eines der Diffusion entgegengerichteten Potentialgefälles, eine wesentlich größere Änderung des Verhältnisses der Ionenströme M_i/M_a entstehen, als durch unabhängige Diffusion erklärbar wäre.

5. Wechselwirkungen zwischen Kalium- und Natriummechanismen

Wird Kalium aus der Außenlösung entfernt, so sinkt die Förderleistung der Na-Pumpe im Cephalopodennerven sofort um etwa 60% ab (Hodgkin u. Keynes, 1954). Vergrößerte K^+-Außenkonzentrationen bewirken dagegen eine nicht sehr große Zunahme des Na^+-Ausstroms um nur 30%, wenn die K-Außenkonzentration etwa verfünffacht wird. Diese Änderung ist nicht durch die Depolarisation verursacht, da Depolarisation allein praktisch wirkungslos bleibt. Die Na^+-Pumpe scheint also in zweckmäßiger Weise keinen membranpotentialabhängigen Mechanismus zu besitzen. Dagegen wird ihre Leistungsfähigkeit spezifisch durch die Außenkonzentration der K-Ionen beeinflußt. Weder die Zunahme noch die Abnahme des Na-Ausstroms können durch Permeabilitätsänderungen der Membran in beiden Richtungen oder Veränderungen des Membranpotentials erklärt werden. Polarisation und Depolarisation haben fast keinen Einfluß auf den Na-Ausstrom. Es muß also eine Wechselwirkung oder eine Koppelung zwischen K-Einstrom und Na-Ausstrom bestehen.

Das Vorhandensein von zwei sekretorischen Vorgängen in der Membran, die voneinander abhängig sind, führt natürlich zu Spekulationen über den Wirkungsmechanismus. Nach Harris u. Maizels (1951) und Hodgkin u. Keynes (1955) kann man folgende Hypothese als wahrscheinlich ansehen.

Die zwei Sekretionsmechanismen sind durch einen Kreisprozeß gekoppelt. Die Aufnahme von K^+ in die Zelle ist von einer Ausstoßung von Na^+ begleitet. Da beide Flußrichtungen den elektrochemischen Gradienten für K bzw. Na entgegengesetzt sind, muß Energie für diesen Kreisprozeß aus dem Stoffwechsel bezogen werden. Der K^+-Einstrom könnte z. B. durch Bindung von K^+ an eine Kaliumüberträgersubstanz X an der Außenseite der Membran entstehen, die auf der Innenseite durch einen Stoffwechselprozeß unter Abgabe des K^+ in einen Na-Überträger Y umgebaut wird, der seinerseits auf der Membranaußenseite nicht stabil ist und sich unter Abgabe von Na wieder in X verwandelt.

Dieser Kreisprozeß (Abb. 4) ist durch Temperaturänderung und Fermentblocker stark, durch Membranpotentialänderungen kaum zu beeinflussen. Sein Endeffekt ist die Herstellung der im Aktionspotential benötigten Konzentrationsgradienten von Na und K. Diese Konzentrationsgradienten wiederum bilden die potentielle Energie, aus der die Ionenströme beim Spitzenpotential hervorgehen. Die Membran verfügt über scharf getrennte Durchtrittsmöglichkeiten für K^+ und Na^+, deren Durchgängigkeit vom Membranpotential abhängt. Wird das Ruhepotential durch äußere elektrische Einflüsse erniedrigt, verändert sich die

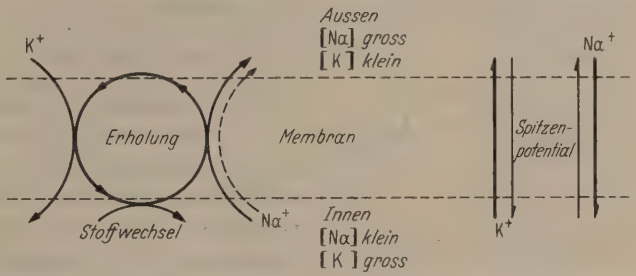


Abb. 4. Schematische Darstellung der für die Erhaltung des Ruhepotentials und für die Entstehung des Aktionspotentials denkbaren Mechanismen. — Links: Aktiver, mit Stoffwechselenergie betriebener Kreisprozeß, der Kalium nach innen und Natrium nach außen pumpt. Die Kopplung zwischen den beiden Pumpen ist nicht sehr ausgeprägt. Es wird (entsprechend der gestrichelten Linie) auch noch Natrium ausgeworfen, wenn kein Kalium aufgenommen wird. Rechts: Passiver, durch Diffusion erklärbarer Ionenaustausch. Für Kalium und Natrium bestehen scharf getrennte Diffusionswege, deren Gangbarkeit mit verschiedener zeitlicher Abhängigkeit durch Änderung des Membranpotentials beeinflußt wird. Die Energie für die Netto-Ionenbewegung für Kalium nach außen und Natrium nach innen wird durch die im links dargestellten Kreisprozeß erzeugten Konzentrationsunterschiede geliefert. (HODGKIN u. KEYNES, 1955a)

Durchlässigkeit in jedem dieser Diffusionswege in zeitlich charakteristischer Weise, so daß mehr Na^+ einströmen und K^+ ausströmen kann als in Ruhe. Es handelt sich aber bei diesen Strömen um rein passive Ionenbewegungen in der Richtung der elektrochemischen Gradienten für die betreffenden Ionen. Auf diesen Mechanismus werden wir nun bei der Besprechung des Erregungsvorganges noch eingehen.

II. Das Aktionspotential

Die soeben besprochene Durchlässigkeit der ruhenden erregbaren Membran für K^+ und Na^+ läßt sich mit geeigneter Versuchsanordnung bei verschiedensten Membranpotentialen, die der Membran aufgezwungen werden, prüfen. Da, wie wir schon anführten, eine Potentialänderung eine Permeabilitätsänderung und damit eine Widerstandsänderung verursacht, muß eine Versuchsanordnung gewählt werden, in der trotz dieser Änderung das Potential konstant gehalten wird. HODGKIN u. HUXLEY (1952a und b) haben auch hier die entscheidenden Versuche an der Riesennervenfaser des Kalmars *Loligo* durchgeführt.

Sie verwendeten zwei zur Faser konzentrische Innenelektroden, die über eine genau definierte Strecke von ihrer Isolationsschicht befreit waren. Zu jeder Elektrode gehörte eine Außenelektrode. Es entstanden somit zwei Elektrodenpaare, von denen das eine zur Depolarisation oder Polarisation eines genau definierten Membranabschnittes diente, das andere zur Messung und Konstanthaltung der durch den Polarisations- oder Depolarisationsstrom erzeugten Spannungsänderung. Durch eine Gegenkopplungseinrichtung wurde dafür gesorgt, daß ein einmal eingestellter rechteckiger Potentialsprung konstant gehalten wurde, auch wenn sich die Membranleitfähigkeit änderte. Die hierfür notwendigen Membranströme wurden registriert und zur Berechnung der Leitfähigkeitsänderung verwendet. Durch Variation der Ionenkonzentration im Außenmedium, speziell durch Verminderung der Na-Außenkonzentration auf Null wurde es möglich zwischen Na^+- und K^+-Leitfähigkeit zu unterscheiden.

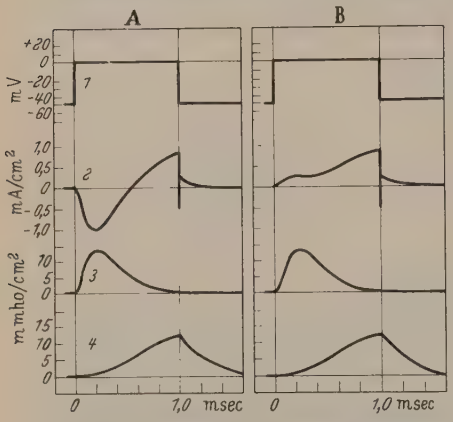


Abb. 5. Änderungen der Membranleitfähigkeit für Natrium und Kalium einer einzelnen Riesen-Nervenfaser von *Loligo* bei Depolarisation der Membran um 50 mV. Temperatur 2° C. — *A*. In künstlichem Meerwasser. — *B*. In Na-freiem künstlichem Meerwasser. 1. Aufgezwungene und konstantgehaltene Potentialdifferenz zwischen Axoplasma und Meerwasser. 2. Ionenstrom durch die Membran, Auswärtsstrom von Kationen nach oben aufgetragen. 3. Anteil der auf Natrium zurückzuführenden Leitfähigkeitsänderung. 4. Anteil der auf Kalium zurückzuführenden Leitfähigkeitsänderung. — Obschon in *A* und *B* die Leitfähigkeitsänderungen gleich sind, hat der Na-Ionenstrom in Na-freiem Medium umgekehrte Richtung, da der elektrochemische Gradient nach auswärts gerichtet ist. (Huxley, 1954)

In Abb. 5 ist der Unterschied des Versuchsergebnisses dargestellt, wenn die mit Elektroden versehene Nervenfaser einmal in Meerwasser, das zweite Mal in einem Na-Ionen freien Meerwasser um genau den gleichen Betrag von 50 mV depolarisiert wird. Das Potential wird in beiden Fällen im Innern der Faser durch Gegenkopplung konstant gehalten. Zuerst fließt ein phasischer Ionenstrom ins Zellinnere, und dann kommt es bei Fortdauer der Depolarisation zu einer Rückkehr des Stroms auf Null und zu einem Umschwenken nach der entgegengesetzten Seite. Fehlt dagegen Na in der Außenlösung, so kommt es zu Beginn der Depolarisation nicht zu einem Einstrom, sondern zu einem Ausstrom von positiven Ionen, gekennzeichnet durch den schwachen, nach aufwärts gerichteten Buckel. Die Erklärung dieses Stromverlaufs ist einfach, wenn man aus dem Resultat des zweiten Experiments den Schluß zieht, daß eine Depolarisation Anstiege der Leitfähigkeit für Na und K bewirkt, die unabhängig voneinander in zeitlich charakteristischer und streng spezifischer Weise verlaufen. Die Na-Leitfähigkeit von etwa 0,01 mmho/cm² Membran steigt 0,1—0,2 msec nach Eintritt der Depolarisation auf etwa 15 mmho/cm² Membran an und fällt dann mit einer Zeitkonstante von etwa 1 msec auf niedrige Werte ab. Die K-Leitfähigkeit von etwa

0,5 mmho/cm² steigt dagegen verspätet auf einer S-förmigen Kurve auf einen ähnlichen Wert an. Beim Ende des Depolarisationsrechtecks fällt sie in exponentiellem Verlauf ohne S-förmigen Beginn wieder auf den Ausgangswert zurück. Das in Abb. 5 angegebene Beispiel zeigt deutlich, daß diese Interpretation auch dann gilt, wenn außen kein Na vorhanden ist. Unter diesen Umständen hat der elektro-chemische Gradient für Na

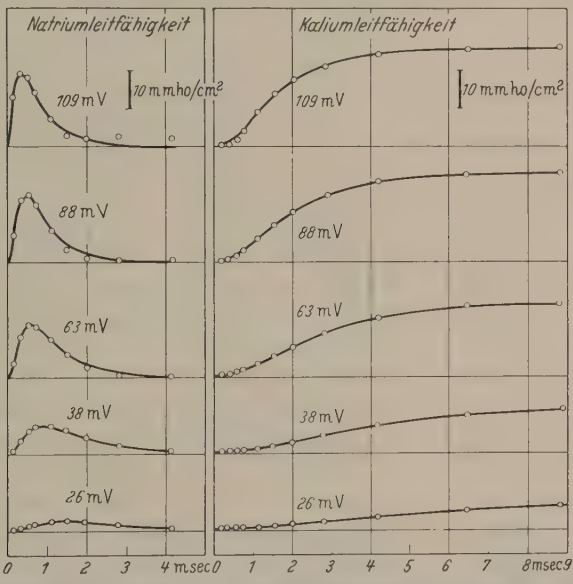


Abb. 6. Veränderungen der Natrium- und Kaliumleitfähigkeit bei verschiedenen Depolarisationen der Membran und Konstanthaltung des Membranpotentials durch Gegenkopplung. — *Loligo*-Riesen-Nervenfaser, 6° C. Die Kurven sind nach der mathematischen Formulierung von HODGKIN und HUXLEY (1952b) berechnet, die offenen Kreise sind die tatsächlichen Meßpunkte derselben Autoren

die umgekehrte Richtung und demnach strömen Na-Ionen aus. Diese Tatsache beeinflußt aber den Permeabilitätsmechanismus überhaupt nicht.

Die eben beschriebenen Änderungen lassen sich für beliebige Potentialniveaus messen (Abb. 6). Es zeigt sich dabei, daß die maximal erreichbare Na-Leitfähigkeitszunahme immer näher an den Depolarisationsbeginn heranrückt und größer wird, je mehr depolarisiert wird. Auch die Steilheit des Anstiegs und die Amplitude der K^+-Leitfähigkeits-Zunahme zeigt ein ähnliches Verhalten. Sämtliche Veränderungen sind vollkommen kontinuierliche Funktionen des Membranpotentials. Sie lassen sich durch eine vorzeitige Repolarisation umkehren.

Die Depolarisation bewirkt also:

a) Ein Öffnen der Membran-Schleusen für Na, das rasch erfolgt und nicht anhält, sondern durch eine „Inaktivierung" rückgängig gemacht wird.

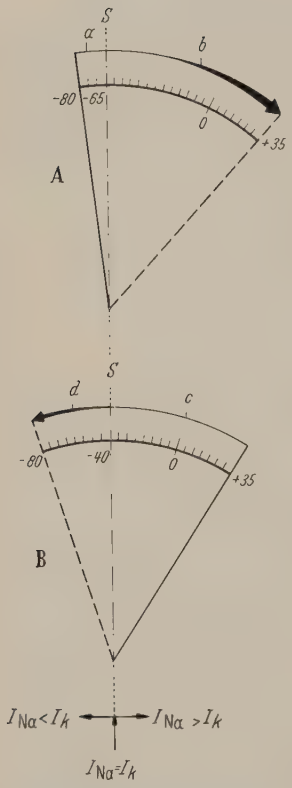


Abb. 7. Schematische Darstellung zur Erklärung der zwei Schwellenwerte des Erregungsvorganges. — *A* Das als Stab dargestellte Membranpotential kann durch eine Depolarisation (*z*) zur Depolarisationsschwelle gebracht werden. Von diesem labilen Gleichgewichtszustand aus kann der Stab entweder nach der Ruhepotentialseite zurück oder nach der Aktionspotentialseite umfallen (*b*). — *B* Beim physiologischen Repolarisationsprozeß wird der Stab durch „Inaktivierung" und Zunahme der Kaliumleitfähigkeit der Membran gegen eine „Repolarisationsschwelle" gehoben (*c*), von der er zum Ruhepotentialniveau zurückfällt (*d*). Dieser Vorgang kann auch vorzeitig durch einen Polarisationsimpuls von Schwellenstärke erzeugt werden. Bei unterschwelliger Polarisation fällt der Stab nach der Na-Seite zurück. — Weitere Erläuterungen im Text

b) Ein verspätetes aber mit der Depolarisation anhaltendes Öffnen der Membran-Schleusen für K^+.

Es bleibt nun die Aufgabe, aus diesen Leitfähigkeitsänderungen das Aktionspotential zu erklären. Die Reizschwelle ist vorerst als *die* Depolarisation zu definieren, bei welcher der (normalerweise kleine) Netto-Na^+-Einstrom durch die Leitfähigkeitserhöhung gleich groß geworden ist wie der ebenfalls passive, dem Konzentrationsgradienten folgende K-Ausstrom. Diese Stelle entspricht dem labilen Gleichgewicht eines Stabs, der nach der Ruhepotential- oder nach der Aktionspotentialseite umkippen kann (Abb. 7 *A*). Übersteigt durch irgend einen Zufall der Na^+-Einstrom den K^+-Ausstrom so entsteht eine weitere Potentialabnahme (da ja in der normalen Faser nicht wie in Abb. 5 eine Vorrichtung zur Konstanthaltung des Membranpotentials vorhanden ist) und diese steigert die Na-Permeabilität. Dieses Spiel wiederholt sich ununterbrochen und die Na-Leitfähigkeit und mit ihr der passive Na-Einstrom schwellen lawinenartig an, bis der „Inaktivierungsvorgang" diese Lawine in einem Zeitpunkt aufhält, wo die zu Beginn erwähnte Na^+-Membranbatterie so leistungsfähig geworden ist, daß *sie* jetzt das Membranpotential diktiert. Es kommt zu einer Positivierung des Axoplasmas gegenüber dem Außenmedium und somit zu einer richtigen Potentialumkehr, wie sie erstmals von Hodgkin u. Huxley (1939) und Curtis u. Cole (1940) mit intracellulären Elektroden gemessen worden ist.

Die „Inaktivierung" vermindert die Leistungsfähigkeit der Na-Batterie, so daß das Membranpotential sich mit zunehmender Inaktivierung immer weiter vom theoretischen Na^+-Potential in Richtung auf das K^+-Potential verschiebt. Gleichzeitig steigt die K^+-Permeabilität der Membran noch an, so daß diese Bewegung des Membranpotentials

beschleunigt wird. Ist die Inaktivierung ein sehr rascher Prozeß, verglichen mit der Zunahme der Kaliumleitfähigkeit der Membran, so wird der Potentialrückgang einen stetigen Verlauf nehmen und ein positives Nachpotential entstehen, wie dies bei *Loligo*-Fasern durch HODGKIN u. HUXLEY (1952b und c) sehr eindrucksvoll nachgewiesen wurde. Es gelingt dort den gesamten Verlauf des Spitzenpotentials bei geeigneter mathematischer Formulierung aus den in Abb. 6 gezeigten Leitfähigkeitsänderungen für Na^+ und K^+ zu berechnen (Abb. 8).

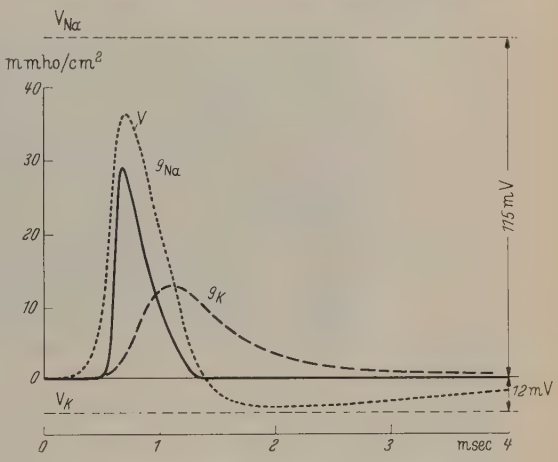


Abb. 8. Zusammenspiel zwischen Veränderungen des Membranpotentials (V), der Natriumleitfähigkeit gNa und der Kaliumleitfähigkeit gK im Spitzenpotential einer Riesenfaser von *Loligo* V_{Na} = theoretisches Na-Potential, V_K = theoretisches K-Potential, berechnet aus den Konzentrationsunterschieden zwischen Axoplasma und Außenmedium. — Die berechnete, gestrichelte Kurve für V entspricht dem tatsächlichen gemessenen Aktionspotential sehr genau. (HODGKIN u. HUXLEY, 1952c)

Die Repolarisationsphase anderer Aktionspotentiale nimmt aber einen weniger glatten Verlauf. Bei der PURKINJE-Faser des Ziegenherzens dauert die Depolarisation auf einem „Plateau" längere Zeit an, um dann ähnlich wie beim Anstieg des Spitzenpotentials schnell wieder abzufallen. Durch Polarisationsimpulse innerhalb des Plateaus kann bei Erreichen einer bestimmten „Polarisations-Schwelle" ein vorzeitiger Potentialrückgang erzielt werden (WEIDMANN, 1951). Auch bei der markhaltigen Nervenfaser ist in der Repolarisationsphase des Aktionsstroms ein deutlicher Knick vorhanden (Abb. 9). TASAKI (1955) hat nachgewiesen, daß auch hier eine Repolarisations-Schwelle vorhanden ist und daß durch überschwellige Polarisationsimpulse ein verfrühter Unterbruch des Aktionsstroms entsteht.

Die Erklärung der „Repolarisations-Schwelle" ist nach dem bisher Gesagten relativ einfach, obschon die Beweise dafür noch fehlen. Die Schwelle ist erneut durch den Zeitpunkt definiert, bei dem der Na-Einstrom und der K-Ausstrom gleich groß sind. Da I_{Na} im Spitzenpotential sehr stark angestiegen ist, liegen die absoluten Werte höher als bei der Depolarisations-Schwelle. Da das Erreichen des Umschlagspunktes relativ spät eintritt, muß ferner angenommen werden, daß die Na-Leitfähigkeit bei diesen Fasern viel langsamer abnimmt als bei *Loligo*, so daß der langsame Rückgang des Aktionsstroms z. B. auf eine verzögerte Inaktivierung

und eine geringere Zunahme der K-Leitfähigkeit zurückgeführt werden könnte. Sobald I_K größer als I_{Na} wird, entsteht eine Beschleunigung des Potentialrückgangs, weil jetzt bei zunehmendem Membranpotential ein Abstellen des verbleibenden Natriumeinstroms erfolgt, der ja seinerseits die Tendenz hatte, das Membranpotential tief zu halten. Abb. 7 B zeigt schematisch die Analogie dieses Geschehens mit der Entstehung des Aktionspotentials an der Depolarisationsschwelle.

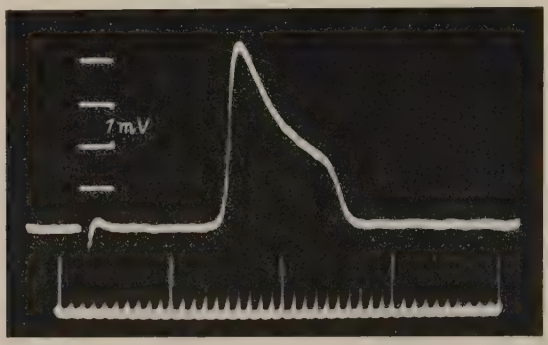


Abb. 9. Aktionsstrom einer markhaltigen motorischen Nervenfaser von *Rana esculenta*. Zeiteichung 0,1 und 1 msec. Temperatur 17° C. Die Repolarisationsphase zeigt eine deutliche Beschleunigung deren Eintritt dem Potentialniveau der „Repolarisations-Schwelle" entspricht. (Stämpfli, unveröff.)

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die Ionentheorie des Erregungsvorgangs heute mit größter Wahrscheinlichkeit nicht nur für die am eingehendsten untersuchten *Loligo*-Riesennervenfasern gilt, sondern daß sie mit Modifikationen der Zeitkonstanten auch für die Erregung der Großzahl anderer erregbarer Membranen angewendet werden kann. Die Erregung darf heute als eine Folge von Durchlässigkeitsänderungen der Membran für Na- und K-Ionen angesehen werden, deren Ablauf dank der zum voraus in Ruhe bereitgestellten potentiellen Energie der Konzentrationsgradienten und des verschiedenartigen Diffusionswegs von Kalium und Natrium auch ohne ersichtlichen Verbrauch an Stoffwechselenergie ablaufen kann.

III. Die Beziehungen der Ionentheorie zur Biochemie

Der aktive Transport von Kalium in die Nervenfaser und von Natrium nach außen ist zweifellos ein chemischer Prozeß. Er bildet die Grundlage zur Erhaltung der Erregungsbereitschaft. Da wir aber über die Erregung zu sprechen haben, interessiert uns nur die Beziehung, daß die Repolarisationsphase des Spitzenpotentials und der Na-Pumpmechanismus gleiche Temperaturabhängigkeit aufweisen. Direkte Beiträge der beiden Stoffwechselpumpen zum Membranpotential sind bis jetzt nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden. Die Blockierung durch Kälte oder

Fermentblocker gibt keine nennenswerte Potentialänderung (Hodgkin u. Keynes, 1955a; Straub, unveröffentlicht). Es wäre höchstens denkbar, daß der Pumpmechanismus in der Repolarisationsphase seine elektrische Neutralität vorübergehend verliert.

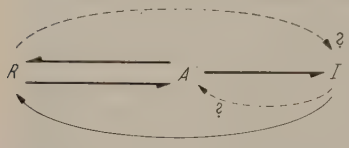
Die wichtigste Frage chemischer Art ist aber die Permeabilitätsänderung für Natrium bei Verminderung des Membranpotentials. Diese Änderung führt zum Aktionspotentialanstieg und streng genommen ist nur dieser als Erregung zu bezeichnen, weil er die Stromschleifen für die Erregungsausbreitung liefert, die im allgemeinen als Kriterium für die stattgehabte Aktivität angesehen wird. Man kann nicht genug darauf hinweisen, daß die Natur dieser Permeabilitätsänderung noch vollständig unbekannt ist. Die starke Temperaturabhängigkeit des zeitlichen Ablaufs der Änderung macht einen chemischen Prozeß wahrscheinlich. Die geringe Beeinflussung der für eine Depolarisation erreichbaren maximalen Leitfähigkeitszunahme durch die Temperatur zeigt andrerseits, daß stets der gleiche Endzustand erreicht wird, wo gleiche Diffusionsbedingungen für Na-Ionen vorhanden sind. Der Vorgang der Permeabilitätsänderung kann durch Lokalanaesthetica und UV-Bestrahlung unterbunden werden — im ersten Falle reversibel, im zweiten irreversibel. Ca^{++}-Entzug erhöht schon die Na-Permeabilität der ruhenden Nervenfaser und verschiebt die „Depolarisations-Schwelle" in die Nähe des Ruhepotentials, Ca-Zugabe macht das Gegenteil. An Spekulationen über die chemischen Grundlagen all dieser charakteristischen Membraneigenschaften fehlt es nicht.

Nachmansohn hatte von jeher Acetylcholin als für den Erregungsprozeß wesentlich angesehen. Er hat diesen Standpunkt neuerdings auch für die Ionentheorie der Erregung angenommen. Acetylcholin in gebundener, inaktiver Form soll durch den elektrischen Strom freigesetzt werden und auf ein Receptorprotein wirken, dessen Veränderung die Ursache der Permeabilitätszunahme für Na sein soll. Durch Cholinesterase wird das Acetylcholin hydrolysiert, der Receptor kommt wieder in die Ruheform und Acetylcholin wird wieder in gebundener Form resynthetisiert. Diese Theorie hat den Nachteil, daß keine überzeugenden Beweise zu ihren Gunsten, aber viele einwandfreie Arbeiten zu ihren Ungunsten sprechen. Auch wird sie den Fragen der „Inaktivierung" nicht gerecht. Straub (1955) hat kürzlich mit einer neuen Methode (Stämpfli, 1954) an markhaltigen Nervenfasern die Wirkung von Acetylcholin, Eserin und Prostigmin auf das Ruhepotential erneut untersucht. Keine der Substanzen hatte selbst in großen Konzentrationen eine signifikante Wirkung, obschon wenigstens Eserin durch die Membran hätte durchtreten können. Bei mit Veratridin behandelten Nervenfasern, die stark Na durchlässig werden und deshalb eine Depolarisation durchmachen, konnte mit Acetylcholin und Eserin eine Repolarisation erreicht werden.

Die Kaliumdepolarisation konnte ebenfalls verlangsamt und etwas verkleinert werden, so daß Straub zum Schluß gelangt ACh, Eserin und Prostigmin seien in ihrer Wirkung mit Cocain und Procain zu vergleichen. Die Spekulation, Acetylcholin bewirke eine Na-Permeabilitätszunahme scheint deshalb unberechtigt. Eher könnte man vorschlagen, es sei an der „Inaktivierung" beteiligt, wenn man ihm doch unbedingt eine Rolle im Erregungsprozeß zuweisen will.

Die Wirkungen von intraaxonal injiziertem Acetylcholin (Grundfest, 1953) ist wie die Wirkung injizierter Ionen (Grundfest und Mitarbeiter, 1954) sehr schwer zu interpretieren, da bei der verwendeten Technik stets auch Artefakte durch Dehnung der Membran entstehen. Die Befunde geben keinen Anhaltspunkt für eine spezifische ACh-Wirkung im Axoplasma oder an der Innenseite der Membran. Auch haben sich nach persönlichen Mitteilungen von Hodgkin die Resultate bei Nachprüfung mit einer verbesserten Injektionsmethode nicht bestätigen lassen.

Die Tatsache, daß das Membranpotential die Na- und K-Leitfähigkeit beeinflußt, macht wahrscheinlich, daß an diesen Vorgängen geladene Membranteilchen beteiligt sind. Hodgkin u. Huxley (1952b) und Huxley (1954) haben darauf hingewiesen, daß die Permeabilitätsänderung sowohl für Na wie für K stärker vom Membranpotential abhängt, als aus der Verschiebung eines Membranteilchens mit einer einzelnen Ladung durch die Depolarisation erwartet werden könnte. Die Permeabilitätsänderung müßte deshalb durch ein Teilchen mit sechs Ladungen oder durch mehrere geladene Teilchen an jeder Ionendurchtrittstelle entstehen. Das als „Überträger" wirkende Teilchen könnte z. B. Kettenstruktur besitzen. Über die angenommenen negativen Ladungen dieser Ketten könnte dann Na entsprechend dem Diffusionsgradienten ausgetauscht werden, falls diese Ketten eine Brücke durch die Membran bildeten. Dabei könnte angenommen werden, in der Ruheform (R) des Überträgermoleküls, sei der Zutritt zur Überträgerkette durch eine Komplexbindung mit Ca^{++} versperrt. Dieses Ca könnte jedoch durch Depolarisation von der Kette gelöst werden. Die Ruheform R würde damit zur aktiven Form A übergeführt, die aber unstabil ist und sich durch „Inaktivierung" in I verwandelt. Ein weiterer hypothetischer Prozeß müßte schließlich I wieder zu R oder A verwandeln können.



Zwischen allen drei Zuständen könnte also in Anlehnung an Weidmann (1955) obiges Reaktionsschema aufgestellt werden.

Alle drei Zustandsformen wären in der ruhenden Membran in einem dymanischen Gleichgewicht vorhanden. Vermehrung der Ca^{++}-Konzentration müßte zu einer Verschiebung des Gleichgewichts nach links, also

zu einer Verminderung von A und Vermehrung von R führen. Eine Schwellen-Aktivierung müßte jetzt eine stärkere Depolarisation verlangen. Ca^{++}-Mangel müßte im Gegenteil zu vermehrter Aktivierung und Inaktivierung führen. Die Na-Durchlässigkeit der Membran müßte steigen und die „Schwellendepolarisation" müßte entsprechend abnehmen.

Diese Vorstellung wird also sowohl dem Verhalten des Aktionspotentials wie auch der Reizschwellen bei Ca-Zugabe oder Wegnahme im Außenmedium gerecht (Hodgkin u. Frankenhaeuser, 1955; Weidmann, 1955; eigene unveröffentlichte Resultate). Auch die Wirkung der Lokalanaesthetica läßt sich in diese Hypothese einbauen. Da sie keine Membranpotentialänderung bewirken, jedoch die Schwellen steigern und eine Abnahme der Amplitude und Anstiegsteilheit des Aktionspotentials zur Folge haben, scheinen sie eine „Inaktivierung" zu erzeugen. Vielleicht kann sich das Lokalanaestheticum mit dem aktivierten Überträger zu einer Form I verbinden, die nicht mehr zu R zurückgeführt werden kann. Die Na^{++}-Durchlässigkeitssteigerung zu Beginn einer Depolarisation und ihr Verschwinden durch „Inaktivierung" bei Fortdauern der Depolarisation könnten also auf chemische Reaktionen im Sinne der oben angedeuteten Arbeitshypothese zurückgeführt werden. Es kann aber nicht genug darauf hingewiesen werden, daß der „Diffusionsweg" nur für Na gangbar ist, und daß diese Tatsache an sich schon ein nicht zu unterschätzendes biochemisches Problem darstellt. Ein Porenmechanismus ist für Na-Ionen ausgeschlossen, weil nicht einzusehen wäre, weshalb er für das kleinere Kaliumion undurchlässig bliebe. Für Kalium kann dagegen sowohl auf Grund der von Hodgkin u. Keynes (1955b) gezeigten Abhängigkeit der Kaliumdiffusionsströme wie auch der Beeinflußbarkeit der K-Durchlässigkeit durch aniso-osmotische Lösungen (Stämpfli u. Nishie, 1955) ein Porenmechanismus in Frage kommen, obschon dafür noch keine schlüssigen Beweise vorliegen.

Der *Repolarisationsvorgang*, dessen Temperaturabhängigkeit schon dafür spricht, daß auch chemische Vorgänge an ihm beteiligt sind, kann als Zusammenspiel der „Inaktivierung" mit der ebenfalls von chemischen Vorgängen abhängigen Zunahme der K-Leitfähigkeit betrachtet werden. Die Dauer der Repolarisationsphase ist sehr leicht durch CO_2, hypertonische Lösungen, Pitressin usw. beeinflußbar, ohne daß die Anstiegsphase überhaupt verändert wird (Stämpfli, unveröffentlicht). Es erübrigt sich aber, hierüber Spekulationen anzustellen, da ganz allgemein noch viel zu wenig über den Mechanismus der Repolarisation bekannt ist.

Vielleicht wird es möglich werden, dank der außerordentlich interessanten Methode von Muralts (1955) mit Hilfe von UV-Lichtblitzen photochemisch angreifbare Phasen des Erregungsvorgangs zeitlich festzulegen. Vorderhand ist das Wissen um die Biochemie des Erregungsprozesses durch die Ionentheorie der Erregung nicht vergrößert worden.

Es hat sich nur klar gezeigt, daß viele Veröffentlichungen über angeblich chemische Veränderungen während des Erregungsprozesses, das Entstehen oder Verschwinden von Substanzen, usw. einer erneuten Überprüfung bedürfen und daß die „Erregung" im hier skizzierten Sinne wohl zum kleinsten Teil als chemischer Vorgang betrachtet werden kann.

Sollte die hier gewählte Darstellungsweise Sie angeregt haben, an der außerordentlich aussichtsreichen Aufklärung der Grundprozesse der Permeabilitätsänderungen erregbarer Membranen mitzuwirken, ist der Zweck der Ausführungen erreicht.

Literatur

Bernstein, J.: Pflügers Arch. **92**, 521 (1902). — Curtis, H. J., and K. S. Cole: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **15**, 147 (1940). — Dean, R. B.: Symposia Soc. f. Exper. Biol. **3**, 331 (1941). — Grundfest, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 136 (1953). — Grundfest, H., C. Y. Kao and M. Altamirano: J. Gen. Physiol. **38**, 245 (1954). — Harris, E. J., and G. P. Burn: Trans. Faraday Soc. **45**, 508 (1949). — Harris, E. J., and M. Maizels: J. of Physiol. **113**, 506 (1951). — Hodgkin, A. L.: Biol. Rev. Cambridge Philos. Sec. **26**, 339 (1951). — Hodgkin, A. L., et B. Frankenhaeuser: XXII Coll. Int. du C.N.R.S. Paris 1955, im Druck. — Hodgkin, A. L., and A. F. Huxley: Nature (Lond.) **144**, 710 (1939). — J. of Physiol. **116**, 449 (1952a); **117**, 500 (1952b). — Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **17**, 43 (1952c). — Hodgkin, A. L., and B. Katz: J. of Physiol. **109**, 240 (1949). — Hodgkin, A. L., and R. D. Keynes: J. of Physiol. **120**, 45 P (1953). — Symposia Soc. f. Exper. Biol. **8**, 423 (1954). — J. of Physiol. **128**, 28 (1955a); **128**, 61 (1955b). — Huxley, A. F.: Ion Transport across Membranes. **23**, 1954. Academic Press N.Y. — Keynes, R. D.: Ph. D. Thesis, University Library Cambridge 1949. — J. of Physiol. **114**, 119 (1951). — Keynes, R. D., and G. W. Maisel: Proc. Roy. Soc. Edinburgh Sect. B **142**, 383 (1954). — Muralt, A. von: XXII Coll. Int. du C.N.R.S., Paris 1955, im Druck. — Nachmansohn, D.: Harvey Lectures **41**, 57 (1953) Academic Press N.Y. 1955. — Shanes, A. M.: J. Gen. Physiol. **34**, 795 (1951). — Stämpfli, R.: Experientia (Basel) **10**, 508 (1954). — Stämpfli, R., u. K. Nishie: Helvet. physiol. Acta **13**, C 33 (1955). — Straub, R.: Helvet. physiol. Acta **13**, C 34 (1955). — Tasaki, I.: Amer. J. Physiol. im Druck, 1955. — Teorell, T.: Arch. Sci. physiol. **3**, 205 (1949). — Ussing, H. H.: Physiologic. Rev. **29**, 127 (1949). — Acta physiol. scand. (Stockh.) **19**, 43 (1949). — Adv. Enzymol. **13**, 21 (1952). — Weidmann, S.: J. of Physiol. **115**, 227 (1951); **129**, 568 (1955).

A. Fleckenstein (Heidelberg): Die Biochemie der Muskelerregung

Mit 2 Textabbildungen

I. Der Kalium-Natrium-Austausch bei Muskeltätigkeit und seine Verknüpfung mit den elektrischen und motorischen Phänomenen

Öffnet man Band 92 von Pflügers Archiv aus dem Jahre 1902, so findet man darin 3 Publikationen, deren Bedeutung erst in unseren Tagen ganz zu ermessen ist. In diesem Band wirft Overton die Frage auf, wie sich die Na^+-Ionen des extracellulären Raumes und die K^+-Ionen des Zellinnern am Verkürzungsakt des Muskels und bei der Erregungsleitung

beteiligen. Overton kommt dabei zu dem Ergebnis, daß sich bei der Erregung der Muskelfasern möglicherweise intracelluläres K^+ gegen extracelluläres Na^+ austauschen müsse, daß dieser Ionenprozeß vermutlich zum Aktionsstrom in Beziehung stehe und daß ein Pumpmechanismus wahrscheinlich sei, der die in die Fasern eindringenden Na^+-Ionen immer wieder abzuschieben habe.

Blättert man weiter, so stößt man im gleichen Band auf die fundamentale Veröffentlichung von J. Bernstein über den Entstehungsmechanismus bioelektrischer Potentiale, auf seine Membrantheorie, in der er die Konzentrationsunterschiede zwischen den extra- und intracellulären K^+-Ionen für die bioelektrischen Spannungen verantwortlich macht und als Ursache des Aktionsstroms sowie des Verletzungsstroms einen Ausgleich dieser Konzentrationsunterschiede annimmt.

Die 3. Publikation stammt von Henze; sie behandelt den Einfluß pharmakologischer Kontrakturstoffe, z. B. von Cholin, Veratrin, Nicotin, Coffein, Chinin auf das Membranpotential von Froschmuskeln. Zum ersten Mal ist hier zu lesen, daß die genannten Kontrakturstoffe in der Lage sind, ein „Demarkationspotential" zu erzeugen, d. h. zu depolarisieren. Die Arbeit ist der Anregung des damaligen Privatdozenten W. Straub zu verdanken und kann als Anfang einer Elektropharmakologie des Muskels gelten.

Tatsächlich stecken diese 3 Publikationen aus dem Jahre 1902 schon in großen Zügen den Rahmen dessen ab, was heute — ein halbes Jahrhundert später — an Grundsätzlichem über die Erregung der Muskelfaser gesagt werden kann.

Es wird im folgenden darauf verzichtet, auf die neuerdings viel bearbeitete neuromuskuläre Erregungsübertragung oder auf die biochemischen Vorgänge an Muskelproteinen (vgl. Dubuisson, 1954) einzugehen. Wegen der speziellen Membranphänomene wird auf das Referat von Stämpfli verwiesen.

a) Die Kationenbewegungen bei Muskelkontraktionen und Muskelkontrakturen

Es ist heute gesichert, daß bei jeder Muskelzuckung K^+-Ionen von der erregten Faser nach außen abgegeben und dafür Na^+-Ionen aufgenommen werden. Zahlreiche Versuche an direkt und indirekt gereizten Kalt- und Warmblütermuskeln führten in diesem Punkte immer wieder zu übereinstimmenden Ergebnissen (Literatur siehe Fleckenstein, 1955). Auch das Herz gibt bei jeder Systole K^+ ab. Besonders genaue Messungen wurden 1952/53 von Wilde u. O'Brien an Schildkrötenherzen durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurde das Herz zuerst in situ mit radioaktivem, intraperitoneal verabreichtem ^{42}K angereichert. Nach einigen Stunden wurde dann das Tier getötet, das Herz isoliert und durch die Coronararterie mit ^{42}K-freier Ringer-Lösung perfundiert. Der venöse

Ausfluß wurde auf rotierendem Filterpapier aufgefangen und pro Systole in etwa 200 Fraktionen unterteilt. Das so gewonnene „Effluogramm" ergab, daß mit jeder Systole eine Wolke von radioaktivem K^+ aus dem Myokard austritt und unmittelbar anschließend im venösen Ausfluß erscheint. Etwa $^1/_{400}$ des Totalbestandes an K^+ wird pro Systole aus der Ventrikelmuskulatur freigesetzt.

Bei den Kontrakturen isolierter Froschmuskeln wird ebenfalls K^+ mobilisiert. Dabei ist es nicht sehr wesentlich, ob die Dauerverkürzungen auf elektrischem Wege (Kathodenwulst), durch chemische Stoffe (pharmakologische Kontrakturen), durch thermische Einflüsse (Wärmekontraktur) oder durch mechanische Behandlung (idiomuskuläre Wülste, Verletzungskontrakturen) hervorgerufen werden. Die K^+-Abgabe beginnt mit der Verkürzung und nimmt mit wachsender Kontraktur weiter zu. Relativ starke K^+-Verluste sind bei den irreversiblen „Schädigungskontrakturen" (Wärmekontraktur, Kontrakturen durch Coffein, Tribromäthylalkohol, Chloroform, Milchsäure, Natronlauge, usw.) zu finden (vgl. Hardt u. Fleckenstein, 1949). Auch die Digitaliskontraktur des Herzens dürfte hierher gehören (vgl. Reiter, 1955). Diese mehr oder weniger irreversiblen — meist schnell zur Starre führenden — Verkürzungszustände sind allerdings nur sehr bedingt mit dem natürlichen Kontraktionsvorgang vergleichbar. Höheres physiologisches Interesse dürfen dagegen die „Erregungskontrakturen" durch Acetylcholin, Nicotin, Veratrin usw. beanspruchen, die bekanntlich an „tonischen" Muskeln wie z. B. am Froschrectus besonders stark und anhaltend sind. Entscheidend für dieses Verhalten ist der Reichtum an tonisch reagierenden „slow muscle fibres" (vgl. hierzu Kuffler u. Vaughan Williams, 1953a, b; Brecht u. Weise, 1953; Krüger, 1952). Die K^+-Abgabe bei Erregungskontrakturen ist geringer als bei Schädigungskontrakturen und wird am besten an durchströmten Muskeln nachgewiesen. Auch hier besteht eine auffällige Beziehung zwischen der Größe der mechanischen Reaktion und den freigesetzten K^+-Mengen. Eserin oder operative Denervierung können z. B. die motorischen Acetylcholin-Effekte erhöhen und potenzieren gleichzeitig an Frosch- und Warmblütermuskeln die K^+-Abgabe (Cicardo u. Moglia, 1940; Klupp u. Kraupp, 1954). Denervierte Hinterschenkel von Katzen sind gegenüber Acetylcholin rund 100mal empfindlicher als im nichtdenervierten Zustand (Kraupp u. Mitarb., 1955). Während bei normal innervierten Warmblütermuskeln praktisch nur die Endplattenregion auf Acetylcholin reagiert, scheint sich die Acetylcholin-Wirkung nach Denervierung auf weitere Bezirke der Fasern auszudehnen. Auch an der glatten Muskulatur des Katzenileums wurden neuerdings von Lembeck u. Strobach (1955) nach der Gabe von Acetylcholin und anderen Stoffen deutliche Zusammenhänge zwischen Kontraktion und K^+-Freisetzung gefunden.

Umgekehrt kann alles, was den Austausch von K^+ und Na^+ beeinträchtigt, Erregung und Kontraktion des Muskels hemmen. Entzieht man z. B. das — für den Eintritt ins Faserinnere benötigte — extracelluläre Na^+, so wird, wie Overton schon 1902 fand, die Erregbarkeit aufgehoben. Ebenso verlieren Acetylcholin, Nicotin, Veratrin und verwandte Stoffe in einem Na^+-freien Milieu ihre Kontraktureffekte.

Besonders deutliche Hinweise auf einen engen Zusammenhang zwischen dem Kationenaustausch und dem Kontraktionsprozeß ergaben sich beim Studium kontrakturhemmender Pharmaka, insbesondere aus der Gruppe der Lokalanaesthetica. Solche Substanzen können bekanntlich nicht nur die Erregung und Erregungsleitung des Nerven unterdrücken, sondern auch den Muskel lähmen. Dabei tritt ein maximal erschlaffter — gegenüber elektrischen Reizen bzw. pharmakologischen Kontrakturstoffen refraktärer — Zustand ein. Die Erklärung dieser muskulären Wirkungen machte lange Zeit Schwierigkeiten. So war z. B. O. Schmiedeberg (1917) der Auffassung, die Lösung muskulärer Kontrakturen durch Lokalanaesthetica hänge mit besonderen Einflüssen auf die Elastizität der contractilen Elemente zusammen. In Wirklichkeit dürfte jedoch die Muskel- und Nervenwirkung der Lokalanaesthetica auf ein- und demselben Mechanismus beruhen: Lokalanaesthetica sind nach unseren Ergebnissen als spezifische Inhibitoren des Kalium-Natrium-Austausches anzusehen; sie sind so Antagonisten der verschiedenen an Nerv oder Muskel ablaufenden Reaktionen (Erregung, Erregungsleitung, Muskelzuckung, Muskelkontrakturen), bei denen dieser Austausch ein notwendiger Bestandteil ist (vgl. Fleckenstein, 1948, 1950a, b, c, d; Hardt u. Fleckenstein, 1949; Fleckenstein u. Hardt, 1949).

b) Die Zusammenhänge zwischen Kationenaustausch, Depolarisation und Verkürzung

Als elektrophysiologisches Äquivalent des Kationenaustauschs ist bei Froschmuskeln im Zustand einer pharmakologischen Kontraktur — in Bestätigung der Entdeckung von Henze — ein Zusammenbruch des Ruhepotentials zu finden. Bei fortgeleiteten Muskelzuckungen zeigt nur die rasch wandernde erregte Zone eine Entladung bzw. Umladung der Membran, bei den verschiedenen pharmakologischen Kontrakturen wird dagegen unter Umständen die ganze Muskelfaser in einen stationären Zustand der Depolarisation versetzt. Umgekehrt bewahren Muskeln, die z. B. durch Novocain oder andere Lokalanaesthetica vor einem Kontrakturstoff geschützt sind — entsprechend der fehlenden K^+-Abgabe und Verkürzung — ihr volles Ruhepotential (Fleckenstein, Wagner u. Göggel, 1950). Solche Muskeln sind für die K^+-mobilisierenden, depolarisierenden Kontrakturgifte unangreifbar geworden und im verlängerten, voll polarisierten Ruhezustand fixiert. Die Grundwirkung der

Lokalanaesthetica und vieler anderer kontrakturhemmender Stoffe (z. B. Atropin, Antihistaminica, Spasmolytica usw.) muß offenbar darin gesehen werden, daß sie den Na^+-Eintritt und damit die Depolarisation und K^+-Abgabe der Muskelfasern durch einen — den Kontrakturstoffen entgegengerichteten — Dichtungs- und Stabilisierungseffekt an den Membranen (vgl. EICHHOLTZ, 1950) verhindern können. Daneben ist die zusätzliche Fähigkeit lokalanaesthetischer Substanzen zu berücksichtigen, depolarisierende Kontrakturstoffe direkt von der Membran — im Sinne einer kompetitiven Hemmung — zu verdrängen. In jedem Falle dürften also die Angriffspunkte pharmakologischer Kontrakturstoffe und ihrer Antagonisten vornehmlich an die Grenzflächen der Fasern zu lokalisieren sein: Depolarisation führt zur Kontraktion, Hemmung der Depolarisation blockiert die Verkürzung. Die gleichen Gesetzmäßigkeiten sind neuerdings auch an der glatten Muskulatur der Taenia coli des Meerschweinchens von BÜLBRING (1955) beobachtet worden. Wir stehen hier an einem Punkte, wo sich Pharmakologie und Physiologie in glücklicher Weise ergänzen; denn die Koppelung zwischen K^+-Freisetzung, Depolarisation und Verkürzung läßt sich auch bei kathodischer Polarisation eines Froschmuskels klar demonstrieren (vgl. SCHAEFER, 1940). Umgekehrt hat die anodische Polarisation — vergleichbar den lokalanaesthetischen Stoffen — Effekte, die der K^+-Freisetzung und Depolarisation entgegengerichtet sind. Die Anode kann daher eine Erregung hemmen bzw. eine bestehende Kontraktur — wie von BIEDERMANN für die Veratrinverkürzung schon 1895 beschrieben worden ist — abschwächen (vgl. hierzu auch KUFFLER, 1946). Auf Grund dieser Analogien ist von uns vorgeschlagen worden, depolarisierende Kontrakturstoffe ihrem Wirkungsmechanismus entsprechend als „Muskel-Katelektrotonica" zu bezeichnen und die kontrakturhemmenden lokalanaesthetischen Stoffe folgerichtig „Muskel-Anelektronica" zu nennen. In Übereinstimmung damit sind am Froschrectus (siehe Tab. 1) zahlreiche depolarisierende Kontrakturstoffe ebenso gut wie durch

Tabelle 1. *Depolarisierende Muskel-Katelektrotonica*
(Kontrakturwirkung durch Anelektrotonus neutralisierbar)

Kaliumchlorid	Adipinbischolin
Rubidiumchlorid	bis-Monoäthyl-Adipinbischolin
Cholin	4-Keto-amyl-trimethylammonium
Acetylcholin	3-Keto-amyl-trimethylammonium
Carbaminoylcholin	2-Keto-amyl-trimethylammonium
Benzoylcholin	3-Keto-butyl-trimethylammonium
Neurin	n-Amyl-trimethylammonium
Tetramethylammonium	Nicotin
Decamethonium	Coniin
Succinylbischolin	Veratrin
bis-Monoäthyl-Succinylcholin	

BOSTON
SEP 6 1957

Lokalanaesthetica auch durch künstliche Repolarisation des Muskels, d. h. durch anodische Polarisation neutralisierbar (vgl. Fleckenstein, 1955): Bei Einschaltung des Anelektrotonus laden sich die depolarisierten und verkürzten Muskeln selbst in stark konzentrierten Lösungen der Kontrakturstoffe wieder elektrisch auf und strecken sich dabei rasch in die Länge. Nach Abschaltung des Stromes kehren die Muskeln dann augenblicklich in den depolarisierten, kontrahierten Zustand zurück. Diese Auslöschbarkeit pharmakologischer Kontrakturwirkungen mittels eines Anelektrotonus beweist schlüssig, daß sie tatsächlich auf nichts anderem als auf einer chemischen Depolarisation beruhen. Auch an der Vogelmuskulatur in situ können die Kontraktureffekte einiger in Tab. 1 aufgeführter Substanzen durch anodische Polarisation durchbrochen werden (vgl. Ginzel, Klupp u. Werner, 1952).

Die physiologisch interessierende Schlußfolgerung aus all diesen Experimenten ist, daß die Motorik der Muskelfasern offenbar durch die elektrischen Ladungsänderungen an ihren Grenzflächen bestimmt wird, wobei die Verkürzung speziell mit der Depolarisation und die Wiederverlängerung speziell mit der Repolarisation gekoppelt ist. Man darf daher wohl annehmen, daß auch die fortgeleiteten Kontraktionen durch die — im Aktionsstrom eintretende — elektrische Entladung bzw. Umladung der Membran verursacht sind, während die Erschlaffung jeweils in Abhängigkeit von der sofort anschließenden Repolarisation erfolgt. Die dem Aktionsstrom bzw. einer lokalisierten Depolarisation zugrunde liegenden Bewegungen von K^+ und Na^+ dürften also auf elektrischem Wege die mechanischen Zustandsänderungen der Muskelfaser induzieren. Die anfangs genannten Arbeiten von Overton, Bernstein und Henze gehen in diesen modernen Vorstellungen auf. Es mag befriedigen, daß diese drei Publikationen nach 50 Jahren nicht mehr — scheinbar beziehungslos — nebeneinanderstehen, sondern zum Fundament eines einzigen und größeren Baues geworden sind.

II. Zum Mechanismus und zur Energetik der restitutiven Kationenverschiebungen

Die Forschungen des letzten Jahrzehnts haben nicht nur den Primat des Elektrischen beim Erregungsvorgang gesichert, sondern auch die Kluft überbrückt, die lange Zeit zwischen der elektrophysiologischen und biochemischen Arbeitsrichtung am Muskel fühlbar war. Die heutige Situation ist dadurch charakterisiert, daß die Bewegungen von K^+ und Na^+ bei der Nerven- und Muskeltätigkeit zu einem gemeinsamen Studienobjekt und zu einer *Nahtstelle* zwischen Elektrophysiologie und Biochemie geworden sind. Das biochemische Interesse konzentriert sich dabei naturgemäß weniger auf die thermodynamisch freiwilligen Kationenbewegungen im Augenblick der Erregung als auf die nachfolgenden

restitutiven Kationenverschiebungen, die dem Diffusionsgefälle entgegengerichtet sind und nur unter Aufwand von osmotischer Arbeit vollzogen werden können.

a) Kationentransport und Muskelstoffwechsel

Durch die biochemischen Forschungen der letzten Jahre sind vor allem zwei Tatsachen von grundsätzlicher Bedeutung herausgearbeitet worden:

a) daß ein nicht unbedeutender Teil der — aus dem Stoffwechsel des Muskels und des Nerven zu beziehenden — Energie zur Stapelung von K^+ und zur Elimination von Na^+ verwendet wird; die Fasern werden auf diese Weise immer wieder elektrisch aufgeladen und nach der Tätigkeit in den voll polarisierten Ruhezustand zurückversetzt,

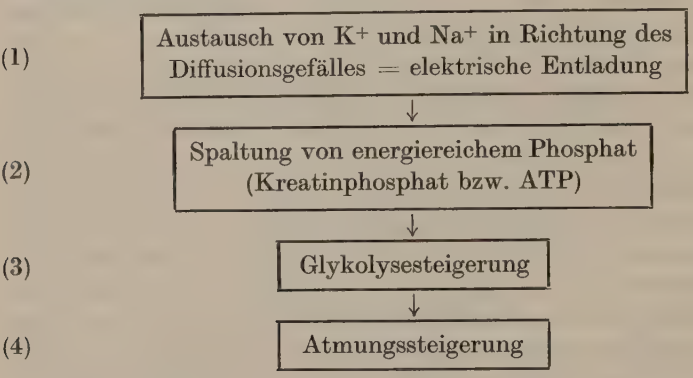
b) daß diese Fähigkeit zum aktiven Kationentransport nicht auf Nerv und Muskel beschränkt ist, sondern eine der fundamentalen Funktionen lebender Zellen (Gehirn, Retina, Niere, Erythrocyten, Hefezellen, Algen, Colibakterien) darstellt.

Die hohen Konzentrationsunterschiede zwischen den extra- und intracellulären K^+- und Na^+-Ionen sinken daher stets ab, wenn die Atmung bzw. Glykolyse durch Verarmung an Substrat oder durch Gifte wie z. B. durch Cyanid, Azid, Monojodessigsäure gehemmt wird. Versuche von Calkins, Taylor u. Hastings mit radioaktivem ^{42}K haben z. B. gezeigt, daß isolierte Rattenzwerchfelle schon in Ruhe bei 37° C etwa 1,5% ihres intracellulären K^+ pro Minute verlieren und durch K^+-Rückresorption von außen wieder ergänzen müssen. Auch dies ist nach Befunden von Leupin u. Verzár (1949) nur möglich, wenn genügend Glucose sowie Insulin zur Verfügung steht. Der Energiestoffwechsel des Muskels dient also nicht nur der chemischen Resynthese von Glykogen, Kreatinphosphorsäure und Adenosintriphosphorsäure, sondern vor allem auch der aktiven Kationenkonzentrierung. Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse, daß die osmotische Energiemenge, die in diesen hohen Konzentrationsunterschieden zwischen den extra- und intracellulären Kationen gestapelt ist, eine beträchtliche Höhe aufweist; sie dürfte z. B. etwa von der gleichen Größenordnung sein wie der Energieinhalt des Kreatinphosphatspeichers, der von Lohmann mit 0,23 cal/g Froschmuskel angesetzt wird. Der Energie-Inhalt des ATP-Speichers beträgt nur $^1/_3$—$^1/_5$ davon. Wir haben daher darauf hingewiesen, daß der „Kaliumspeicher" als physikalisch-chemischer Energiespeicher den konventionellen chemischen Energiespeichern des Muskels an die Seite gesetzt werden muß (Fleckenstein, 1942; 1947).

Die speziellen Reaktionen, mit deren Hilfe die Zellen K^+ und Na^+ während der Erholungsphase gegen das Konzentrationsgefälle

verschieben, sind noch nicht voll aufgeklärt. Zahlreiche Befunde aus den letzten Jahren lassen jedoch erkennen, daß die für den aktiven Kationentransport benötigte Energie wahrscheinlich nicht unmittelbar aus Atmung oder Glykolyse bezogen wird, sondern dem Vorrat an energiereichem Phosphat (ATP bzw. Kreatinphosphat) entstammt. Besonders gute Einblicke ergaben sich durch Anwendung von 2,4-Dinitrophenol. Diese Substanz kann nach Loomis u. Lipmann (1948) die Prozesse der Atmung und Phosphorylierung entkoppeln. Trotz eines Anstiegs des Sauerstoffverbrauchs und der Glykolyse kommt es daher rasch zu einer Verarmung an energiereichen Phosphorsäureestern. Der M. rectus des Frosches verliert z. B. nach unseren Untersuchungen während 15 bis 20 min Einwirkung von Dinitrophenol in Konzentration 1:10000 bei 20° C fast seinen gesamten Kreatinphosphat-Bestand. Gleichzeitig damit kommt der aktive Kationentransport und die Fähigkeit zur vollen elektrischen Wiederaufladung zum Erliegen. Dinitrophenol kann so in den meisten bisher geprüften Zellen und Geweben mit aerobem Stoffwechsel die K^+-Stapelung und Na^+-Elimination stoppen. Die ersten Beobachtungen dieser Art wurden 1950 von Terner, Eggleston u. Krebs an Hirngewebe mitgeteilt. Kurze Zeit später wurde dann der gleiche Block des Kationentransports von Mudge (1951) sowie von Whittam u. Davies (1953) an Nierengewebe, von Lewinsky u. Sawyer (1953) an Froschhaut, von Hodgkin u. Keynes (1953; 1955) an Tintenfischnerven und von Maizels (1954) an Hühnererythrocyten aufgefunden. Der Gehalt an energiereichen P-Estern, speziell ATP, geht dem K^+-Gehalt verschiedener Erythrocyten-Arten (Mensch Schwein, Kaninchen, Hund, Ratte, Katze, Rind, Pferd, Tauben) nicht parallel (Flekkenstein u. Gerlach, 1953). Doch ließ sich neuerdings an Menschen- und Taubenerythrocyten zeigen, daß der Stop des aktiven Kationentransports nach Anwendung von Monojodessigsäure, Cyanid und Dinitrophenol mit einem Stop der Aufnahme von radioaktivem $^{32}PO_4$ in die ATP-Fraktion bzw. mit einem Schwund an ATP zusammenhängt (vgl. Gerlach, 1955). Umgekehrt ist es neuerdings in Versuchen aus dem Straubschen Institut in Budapest gelungen, menschliche Erythrocyten durch Baden in einer ATP-Lösung künstlich mit ATP zu beladen. Dieses Überschuß-ATP verfällt dann dem Abbau und führt dabei zu einer starken intracellulären K^+-Anhäufung (Straub, 1953; Gárdos, 1954). Davies u. Krebs haben 1952 eine umfassende Theorie des aktiven Kationentransports entwickelt; auch diese Theorie sieht für ATP eine Schlüsselstellung in den Prozessen des aktiven Kationentransports vor. Die angeführten Ergebnisse dürften gerade für die Muskel- und Nervenphysiologie sehr wichtig sein; denn sie weisen den energiereichen Phosphorsäure-Estern eine Rolle im Rahmen der *restitutiven* Prozesse zu. Zweifellos sind noch viele Einzelheiten unbekannt. Als Grundschema des

Erregungsstoffwechsels dürfte jedoch nach unseren heutigen Kenntnissen folgende Reaktionskette hinreichend gesichert sein:



Nur das erste Glied in dieser Kette, d. h. der Austausch von K^+ und Na^+ dürfte also mit dem eigentlichen Erregungsvorgang zu identifizieren sein, während das zweite Glied, d. h. die Spaltung von energiereichem Phosphat vermutlich schon wieder der Auffüllung des K^+-Speichers — unter Abschiebung von Na^+ — dient. Das energiereiche Phosphat wird dann seinerseits durch die Reaktionsfolge (3) und (4), d. h. durch Glykolyse und Atmung regeneriert. Die hier aufgezeichnete Reaktionskette ist wahrscheinlich in den Muskel- und Nervenfasern, in den elektrischen Organen von Fischen sowie in den Gehirnzellen im Prinzip identisch. Alle diese Gebilde funktionieren anscheinend — trotz ihrer ganz verschiedenen Differenzierung — nach einem einheitlichen Grundprinzip: Sie stellen wahrscheinlich übereinstimmend eine Art „Kaliumbatterie" dar, die sich jeweils mit Hilfe des Stoffwechsels unter Elimination von Na^+ elektrisch auflädt und dann bei Erregung unter Aufnahme von Na^+ wieder entlädt. Die Rolle des „primären" Energiespeichers kommt also im Muskel nach heutiger Auffassung dem „Kaliumspeicher" zu, der als erster zur Entladung gebracht wird, wenn ein Reiz die Membran trifft. Bisher wurde meist die Umsetzung von ATP als früheste energetisch ausnutzbare Reaktion im tätigen Muskel angesehen. Diese Auffassung trifft also nicht mehr zu.

b) Energetische Probleme

Der Aktionsstrom des Muskels soll nach einer weitverbreiteten Vorstellung lediglich die Bedeutung eines „zündenden Funkens" für das eigentliche chemische „Pulverfaß" besitzen, aus welchem dann die Kontraktionsenergie explosionsartig freigesetzt wird. Diese Hypothese gründet sich hauptsächlich auf 2 Annahmen,

a) daß die mit den elektrischen Prozessen verknüpften Energieverschiebungen viel zu gering sind, um als Quelle der Kontraktionsenergie in Betracht gezogen zu werden, und

b) daß bei der Muskelverkürzung irgendeine chemische Spaltungsreaktion von erheblichem Ausmaß abläuft, aus der die Kontraktionsenergie unschwer gedeckt werden kann.

Tabelle 2. *Elektrische Energieproduktion der isolierten Froschhaut und der Magenschleimhaut* (nach Crane, Davies u. Longmuir, 1948)

Gewebe	Temperatur °C	Höhe des Potentials mV	Größte beobachtete Stromstärke mA/cm² Membran	Größte beobachtete elektr. Leistung µWatt/cm²	Größte beobachtete elektr. Leistung µW/mg Trockengew.	Nutzeffekt der elektr. Energieproduktion %	Autoren
Isolierte Froschhaut	20	—	0,015	2,5	0,5	5—10	[1] Francis (1933)
„	25	40	0,02	0,8	0,15	1—2,5	[2] Stapp (1941)
Hundemagen	39	60	0,15	8,9	0,34	2—4,5	[3] Rehm (1943)
Isolierte Mucosa des Froschmagens	25	40	0,04	1,6	0,26	max. 10	[4] Crane, Davies u. Langmuir (1948)

[1] Francis, W. L.: Nature (Lond.) **131**, 805 (1933).
[2] Stapp, P.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **46**, 382 (1941).
[3] Rehm, W. S.: Amer. J. Physiol. **139**, 1 (1943).
[4] Crane, E. E., R. E. Davies and N. M. Longmuir: Biochemic. J. **43**, 321 (1948).

Beide Annahmen sind seit mehr als 100 Jahren für zahlreiche Kontraktionstheorien bestimmend gewesen und werden gewöhnlich heute noch akzeptiert. Trotzdem ist ihre experimentelle Fundierung unzureichend. Es ist z. B. a priori nicht zutreffend, wenn man die elektrische Energieproduktion lebender Gewebe für quantitativ bedeutungslos hält. Selbst isolierte Froschhaut oder isolierte Magenschleimhaut — beides Gewebe, deren elektrische Tätigkeit wenig augenfällig ist — können elektrische Energien liefern, die bis zu 10% der aus den oxydativen Prozessen zu gewinnenden Energie ausmachen. Man braucht bei beiden Geweben nur die äußere (negative) Oberfläche mit der inneren (positiven) Oberfläche kurzzuschließen, um einen gut meßbaren Dauerstrom von der in Tab. 2 angegebenen Stärke zu erhalten.

Die genauen Beziehungen zwischen der elektrischen Arbeit und den Umsetzungen der energiereichen Phosphorsäure-Ester speziell Kreatinphosphat sind bisher nur für das elektrische Organ von Electrophorus electricus bekannt. Hier fanden Nachmansohn, Cox, Coates und

Machado (1943) bei einer längeren Serie von Schlägen eine elektrische Energieproduktion, die etwa 25—50% der chemischen Spaltungsenergie des abgebauten Kreatinphosphat (angenommen als 10000 cal/Mol) ausmachte. Im elektrischen Organ dieser Fische wird also offenbar aus energiereichem Phosphat mit 25—50% Nutzeffekt elektrische Arbeit gewonnen. Die Größe der elektrischen Energieproduktion ist in den elektrischen Organen nur deshalb besonders auffällig, weil hier die einzelnen Elemente — im Gegensatz zu Muskel und Nerv bzw. Froschhaut und Magenschleimhaut — in Serie geschaltet sind. Die Aktionspotentiale der einzelnen elektrischen Platten sind dagegen nur wenig höher als bei Muskel- und Nervenfasern.

Ein indirekter Weg zur Erfassung der während des Muskelaktionsstroms freigesetzten Energie besteht in der Bestimmung der ausgetauschten Menge an K^+ bzw. Na^+. Die Änderung der freien Energie, die mit diesem Austausch verknüpft ist, läßt sich nach folgender Formel berechnen (vgl. Fleckenstein, 1942):

$$A = RT\,x\left(\ln\frac{K_i}{K_e} + \ln\frac{Na_e}{Na_i}\right).$$

Dabei ist R die Gaskonstante = 2 cal, T = absolute Temperatur; x = ausgetauschte Menge an K^+ bzw. Na^+ in Mol.

K_i und K_e sind die intracelluläre und die extracelluläre K^+-Konzentration. Na_i und Na_e sind die extra- und intracelluläre Na^+-Konzentration.

Als Überführungsarbeit für 1 γ K^+ (im Austausch gegen Na^+) ergibt sich dann beispielsweise etwa 3—4 gcm. Diese Arbeit muß aufgewendet werden, um während der Erholung 1 γ K^+, unter Abschiebung von Na^+, zurückzuresorbieren; umgekehrt entlädt sich die Faser um den gleichen Energiebetrag, wenn sie bei der Erregung 1 γ K^+ unter Aufnahme einer äquivalenten Menge Na^+ abgibt.

Der bisher zuverlässigste Wert für die K^+-Freisetzung aus tätiger Muskulatur dürfte in den Untersuchungen von Wilde u. O'Brien (1953) mit radioaktivem ^{42}K an Schildkrötenherzen ermittelt worden sein. Wie bereits erwähnt, fanden diese Autoren eine K^+-Freisetzung von 1/400 des Gesamtbestandes je Systole. Bei einem K^+-Gehalt der Ventrikelmuskulatur von etwa 400 mg% würden also rund 10 γ K^+/Systole/g Herzmuskel ausgetauscht. Die berechnete Überführungsarbeit für diese 10 γ K^+ beträgt dann 30—40 gcm/Systole/g Herzmuskelmasse, während die Kontraktionsarbeit des Schildkrötenherzens unter physiologischen Arbeitsbedingungen nach Angaben von Reichel (1955) bei 10 gcm/Systole/g Herzmuskel liegt. Man muß aus diesem Resultat folgern, daß die mechanische Arbeit des Schildkrötenherzens sich offenbar in der gleichen Größenordnung bewegt wie der osmotische bzw. elektrische Energiebetrag, um den sich der Ventrikel beim Kationenaustausch in Form des Aktionsstroms entlädt. Schon der Austausch von 1/1000 des Faser-

kaliums würde der systolischen Arbeit des Schildkrötenventrikels äquivalent sein. Es ist dringend erforderlich, auch an anderen Muskeltypen derartige quantitative Studien über die Relation zwischen K^+-Abgabe und Kontraktionsarbeit durchzuführen. Sollten sich hier ähnliche quantitative Verhältnisse wie beim Schildkrötenherz ergeben, so wäre die Wahrscheinlichkeit groß, daß die K^+- und Na^+-Bewegungen (bzw. die damit verknüpften elektrischen Ladungsänderungen) für die Zustandsänderungen des contractilen Systems *unmittelbar* bestimmend sind; der Aktionsstrom wäre dann unter Umständen nicht ein „zündender Funke", sondern der direkt zur Muskelzuckung führende Grundprozeß. Wie man sich einen solchen Mechanismus im Prinzip vorstellen könnte, ist vielleicht am besten aus den Kontraktionsmodellen von Kuhn u. Hargitay (1951a, b) abzuleiten. Auch diese künstlichen contractilen Systeme (Polyacrylsäure-Polyvinylalkohol-Filme) strecken sich bei elektrischer Aufladung in die Länge und ziehen sich unter bedeutender Spannungsentwicklung wieder zusammen, wenn sie ihre Ladung verlieren. Die Fadenmoleküle werden dabei infolge elektrostatischer Abstoßung ihrer Ladungen in den gestreckten Zustand versetzt; bei Neutralisation der Ladungen gehen die Fäden dann wieder spontan, d. h. der natürlichen Tendenz zur Desorientierung folgend, in den statistisch wahrscheinlicheren, stärker gefaltenen Zustand über. Aktiv ist also bei den angeführten künstlichen Systemen die — durch elektrische Kräfte erzwungene — Entfaltung der contractilen Elemente; spontan ist dagegen die — nach Verlust der elektrischen Aufladung eintretende — Rückkehr in den kontrahierten, stark geknäulten Zustand. Das Prinzip einer derartigen „aktiven" Erschlaffung ist bekanntlich für den Muskel schon 1911 von Bethe zur Diskussion gestellt worden. Ein elektrostatischer Kontraktionsmechanismus von der angedeuteten Art würde also mit der Betheschen Grundvorstellung in bester Übereinstimmung stehen (näheres vgl. Fleckenstein, 1955).

III. Muskelkontraktion und Adenosintriphosphat

Die Notwendigkeit einen primär-elektrischen Kontraktionsmechanismus als Alternative zu den konventionellen chemischen Theorien zu diskutieren ist auch deshalb gegeben, weil die Suche nach einer — mit der Kontraktion obligatorisch gekoppelten — chemischen Spaltungsreaktion bisher im lebenden Muskel wenig erfolgreich war. Insbesondere ist es in den letzten Jahren sehr zweifelhaft geworden, ob ATP wirklich bei der normalen, voll reversiblen Kontraktion lebender Muskeln in energetisch ausreichendem Maße gespalten wird, bzw. ob die an contractilen Präparaten gewonnene Schlüsse auch für die intakte Muskulatur Gültigkeit besitzen. Tatsächlich sind so gut wie alle Argumente, die für eine unmittelbare Lieferung der Kontraktionsenergie aus ATP zu

sprechen scheinen, auf indirektem Wege gewonnen worden, d. h. an isolierten Muskelproteinen, Actomyosinfäden, Glycerin-Wasser-extrahierten Fasern oder an Muskeln in irreversibler Starreverkürzung. Dagegen fehlte für die getrennte Mikrobestimmung von ATP neben ADP in kleinen Extraktmengen aus lebender Muskulatur bis vor kurzem eine zuverlässige chemische Methode. Erst die Entwicklung der Papierchromatographie von Phosphorsäure-Estern durch Hanes u. Isherwood (1949) sowie Eggleston u. Hems (1952) schuf hier neue Möglichkeiten. Besonders vorteilhaft ist dabei, daß ATP und ADP nach erfolgter Trennung in den Chromatogrammen noch in γ-Mengen durch UV-Licht (Wellenlänge 260 mμ) direkt sichtbar zu machen sind. Zur chemischen Bestimmung von ATP und ADP werden die UV-absorbierenden Areale anschließend ausgeschnitten, feucht verascht und ihr Phosphorgehalt ermittelt.

a) Das Verhalten von ATP und ADP bei Muskelkontrakturen und bei tetanischer Reizung

Das wesentlichste Ergebnis, das die Anwendung dieser neuen Methoden auf muskelphysiologischem Gebiet brachte, war zunächst, daß sich hinter den Längen- bzw. Spannungsänderungen des Muskels keine irgendwie ins Gewicht fallenden Konzentrationsänderungen an ATP und ADP verbergen (Fleckenstein u. Janke, 1953; Fleckenstein, Janke, Davies u. Krebs, 1954; Fleckenstein, Janke, Kruse u. Lechner, 1955). So weist z. B. der M. rectus abdomn. vom Frosch im Zustand einer reversiblen Kontraktur (KCl, Acetylcholin, Nicotin, Succinylcholin) praktisch denselben ATP- und ADP-Gehalt auf wie im Ruhezustand. Anders ist das Verhalten bei irreversiblen Starreverkürzungen: Coffein (½% in Ringer-Lösung) kann z. B. bei 20° C gleichzeitig mit der Ausbildung der Starreverkürzung einen massiven ATP-Zerfall im Laufe von 3 min hervorrufen. Dagegen kann sich die Coffein-Verkürzung bei 0° C während 3 min ohne ATP-Zerfall ausbilden (Fleckenstein, Janke u. Elke, 1954).

Weitere Versuchsreihen wurden an elektrisch gereizten Muskeln bei 0° und 20° C durchgeführt (Fleckenstein, Janke, Lechner u. Bauer-1954). Bei diesen Experimenten wurde der eine M. rectus schon 1,0 bis 1,2 sec nach Reizbeginn — kurz vor Erreichung des Gipfels der tetanischen Kontraktionskurve — in flüssigem Stickstoff versenkt, während der paarige Kontrollmuskel im verlängerten Ruhezustand zum Einfrieren kam. Tab. 3 zeigt, daß auch in diesen tetanisch verkürzten Muskeln — innerhalb einer Fehlergrenze von 0,05 μmol ATP/g Muskel — keine Veränderung des ATP- und ADP-Gehalts zu finden war. Nimmt man als Spaltungsenergie von ATP zu ADP 12000 cal/mol an, so müßte in den Versuchen bei 0° C zur Deckung der gemessenen Kontraktions-

arbeit — selbst bei 100% Nutzeffekt — eine ATP-Abnahme von mindestens 0,24 μmol ATP/g Muskel gefordert werden, d. h. etwa 10% des Gesamtbestandes an ATP[1]. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine solche ATP-Abnahme in diesen Versuchen tatsächlich eintrat, aber übersehen wurde, ist nach der statistischen Analyse weniger als 1:1000 (Wahrscheinlichkeit $< 0{,}001$). Es ist hieraus zu folgern, daß ATP während der kurzen

Tabelle 3. *Einfluß eines kurzen Tetanus auf den Gehalt des Froschrectus an ATP, ADP und Kreatinphosphat*
(Weibliche Temporarien, Reizfrequenz 12/sec)

		ATP μmol/g	ADP μmol/g	Kreatinphosphat μmol/g	Arbeit gcm/g
12 Rectus-Paare gereizt für 1,0—1,2 sec bei 20° C	kontrahiert	2,77	0,87	11,25	190 (±11,1)
	ruhend	2,77	0,91	13,32	47,7* (±4,4)
	mittl. Differenz mittl. Fehler	0,00 (±0,053)	—0,04 (±0,049)	—2,07 (±0,38)	
20 Rectus-Paare gereizt für 1,0—1,2 sec bei 0° C	kontrahiert	2,82	0,71	11,46	125,3 (±20,8)
	ruhend	2,80	0,70	11,14	
	mittl. Differenz. mittl. Fehler	+0,02 (±0,040)	+0,01 (±0,032)	+0,32 (±0,20)	

* Die Kontrollmuskeln in der Versuchsreihe bei 20° C verkürzten sich beim Einfrieren.

Reizperiode von 1,0—1,2 sec entweder überhaupt nicht in energetisch ausreichendem Maße gespalten wird oder schon während der Kontraktion eine vollständige Regeneration erfährt. In Frage käme vor allem eine Resynthese von ATP auf Kosten von Kreatinphosphat. In der Versuchsserie bei 0° C blieben jedoch nicht nur die ATP-Werte sondern auch die Kreatinphosphatwerte während des Tetanus von 1,0—1,2 sec konstant. Eine ATP-Resynthese aus Kreatinphosphat ist daher unter diesen Bedingungen mit hinreichender Sicherheit auszuschließen. Auch die Möglichkeit eines raschen Wiederaufbaus von Kreatinphosphat scheidet aus; denn im M. rectus werden bei 0° C nur 0,003—0,006 μmol Kreatinphosphat/g Muskel/sec zurückgebildet.

[1] Nach neuen Messungen von Kitzinger u. Benzinger (1955) dürfte die Wärmetönung der ATP-Spaltung nicht 12000 sondern nur 4800 cal/mol betragen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die freie Energie der ATP-Spaltung mit 12000 cal/mol zu hoch angesetzt ist. Zur Deckung der Kontraktionsenergie müßte dann u. U. noch erheblich mehr als 0,24 mol ATP/g Muskel abgebaut werden.

Zu ähnlichen Resultaten führten Experimente an Rectuspaaren, die durch vorherige Vergiftung mit 2,4-Dinitrophenol über 90% ihres Kreatinphosphatgehaltes eingebüßt hatten. In solchen Muskeln ist die Möglichkeit einer raschen Resynthese von ATP aus Kreatinphosphat nicht mehr gegeben. Reizung bei 0° C führte jedoch auch hier zu einer kräftigen Kontraktion, ohne daß während der ersten 3,5 sec eine ATP-Abnahme erfaßbar war. Dagegen hat die Reizung solcher kreatinphosphatverarmter Muskeln in der Wärme bei 20° C schon nach 1 sec einen signifikanten ATP-Zerfall zur Folge. Man darf nach diesen Ergebnissen annehmen, daß sich der Froschrectus tatsächlich in der Kälte bei 0° C rascher tetanisch kontrahiert als die Spaltung einer energetisch ausreichenden Menge an ATP oder Kreatinphosphat in Gang kommt. Würde die Kontraktionsenergie aus dem ATP-Zerfall bestritten werden, so müßten gerade bei tiefer Temperatur und kurzer Reizzeit die größten ATP-Abnahmen zu erwarten sein; denn bei 0° C müßte eine eventuelle Wiederauffüllung des ATP-Speichers viel langsamer als bei 20° C verlaufen. Neuerdings hat auch Mommaerts (1954) über Kontraktionen gekühlter Schildkrötenmuskeln berichtet, die ebenfalls ohne energetisch ausreichende Spaltung von ATP oder Kreatinphosphat verliefen.

Die mitgeteilten Befunde schließen natürlich nicht aus, daß im tätigen Muskel eine Spaltung von ATP zu ADP stattfindet, die unter der Fehlerbreite der chemischen Bestimmungsmethoden liegt. So hat kürzlich Britton Chance (1955) bzw. Connelly u. Britton Chance (1954) am Froschsartorius durch Messung der Absorptionsbanden des hydrierten Pyridinnucleotids indirekte Hinweise dafür gewonnen, daß wahrscheinlich pro Kontraktion etwa 0,008 μmol ADP/g Muskel gebildet werden. Dieser Wert ist rund 30 mal geringer als nach der ATP-Theorie der Kontraktion als Minimum zu fordern wäre. Von H. H. Weber (1955) wurde neuerdings die Vorstellung vertreten, eine stärkere ATP-Abnahme könne bei der Kontraktion deshalb nicht beobachtet werden, weil ATP unter Umständen auf Kosten der neuentdeckten Triphosphate (Uridintriphosphat, Cytidintriphosphat, Guanosintriphosphat) regeneriert werde. Gegen diesen Gedanken spricht jedoch, daß der Lohmannsche 7 min-hydrolysable Phosphor während eines kurzen Tetanus nicht abnimmt (vgl. Lohmann, 1928, 1930, 1934); in dieser Fraktion würden außer ATP auch die anderen Triphosphate miterfaßt.

b) Der Austausch von radioaktivem $^{32}PO_4$ mit dem α-, β- und γ-Phosphor von ATP sowie mit dem Kreatinphosphor in Abhängigkeit von Temperatur und Muskeltätigkeit

Um keine Möglichkeit zur Erfassung gesteigerter ATP-Umsetzungen bei Muskeltätigkeit auszulassen, wurden isolierte M. recti von Esculenten unter Variation der Arbeits- und Temperaturbedingungen radioaktiven

Phosphat-Ringer-Lösungen[1] ausgesetzt. Anschließend wurden die Muskeln papierchromatographisch aufgearbeitet und die Aufnahme von $^{32}PO_4$ in die einzelnen Phosphorsäure-Ester ermittelt[2] (Davies, Fleckenstein u. Janke, 1954; Fleckenstein, Janke u. Davies, 1955). Die individuellen Geschwindigkeiten des Einbaues von $^{32}PO_4$ in die α-, β- und γ-Position von ATP wurden dabei nach einem besonderen Verfahren getrennt bestimmt.

Tabelle 4. *Relative Austauschgeschwindigkeiten* des α-, β- und γ-Phosphors von ATP und des Kreatinphosphors im ruhenden Froschrectus*
(30 min Exposition der Muskeln in $^{32}PO_4$-Ringer-Lösung bei 20° C)

	ATP			Kreatin-P
	αP	βP	γP	
Mittelwerte von 10 Versuchen	1,9 (± 0,4)	29,0 (± 3,3)	100	70,1 (± 1,6)

* Spez. Aktivität des γP von ATP = 100.

Tab. 4 gibt zunächst die Mittelwerte aus 10 Versuchenam ruhenden Froschrectus bei 20° C und bei 30 min Exposition in einer radioaktiven Phosphat-Ringer-Lösung wieder. Setzt man die Austauschgeschwindigkeit des endständigen Phosphors von ATP, d.h. des γ-Phosphors gleich 100, so beträgt die relative Austauschgeschwindigkeit des mittleren Phosphors von ATP, d. h. des β-Phosphors, 29 und des α-Phosphors nur 1,9. Die Austauschgeschwindigkeit des Kreatinphosphors liegt dagegen mit 70,1 zwischen der Aktivität des β- und γ-Phosphors. Die Turnover-Geschwindigkeit des endständigen γ-Phosphors von ATP ist also stets am höchsten.

Während diese relativen Geschwindigkeiten durch Variation der Temperatur nicht wesentlich beeinflußt werden, sinken die absoluten Austauschgeschwindigkeiten bei Kühlung der Muskeln von 20° C auf 0° C stark ab. Abb. 1 zeigt, daß der ruhende M. rectus in die einzelnen Fraktionen bei 0° C annähernd 20mal langsamer radioaktiven Phosphor aufnimmt als bei 20° C. Die drosselnde Wirkung der Kälte auf die Umsetzungen von energiereichem Phosphat wird hier besonders gut sichtbar. Der Q_{10} für den Temperaturbereich von 0—20° C dürfte demnach im groben Durchschnitt über 4 betragen.

[1] Phosphatgehalt 3,8 mg-%, Gesamtaktivität etwa 1 mC in 30 ml Lösung.

[2] Die spez. Aktivitäten wurden nach der chemischen Phosphorbestimmung (Methode von Berenblum u. Chain, 1938) durch Zählung des gelösten Phosphor-Molybdatkomplexes in einem Flüssigkeitszählrohr festgestellt und jeweils in Prozent der spez. Aktivität des extracellulären Phosphors ausgedrückt.

Die Einbaugeschwindigkeit von $^{32}PO_4$ in die ATP und Kreatinphosphat-Fraktion kann also durch Änderung der Temperatur beliebig variiert werden. *Im Gegensatz dazu hat elektrische Reizung keine Steigerung der $^{32}PO_4$-Aufnahme zur Folge.* Abb. 2 gibt Experimente bei 0° und 20° C wieder. In der Versuchsreihe bei 0° C wurden die „Arbeitsmuskeln" (A) während 30 min 10mal im Abstand von jeweils 3 min für je 10 sec tetanisch gereizt (Frequenz 12/sec); die paarigen „Ruhemuskeln" (R) verblieben als Kontrolle ebenfalls für 30 min in der gleichen radioaktiven Lösung. Das Ergebnis ist eindeutig. Der Einbau von $^{32}PO_4$ in die einzelnen Fraktionen geht in den Ruhe- und Arbeitsmuskeln gleich schnell vor sich.

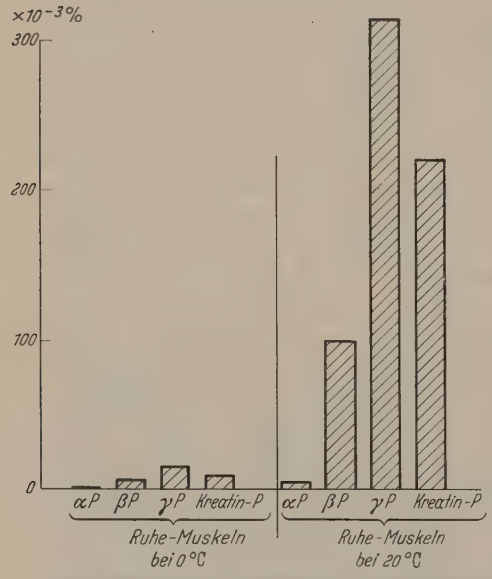


Abb. 1. Einfluß der Temperatur auf die Geschwindigkeit des Einbaus von $^{32}PO_4$ in die ATP- und Kreatinphosphat-Fraktion bei 30 min Aufenthalt ruhender M. recti in $^{32}PO_4$-Ringer-Lösung. Spezifische Aktivität ausgedrückt in Prozent der spezifischen Aktivität des extracellulären PO_4

In der Versuchsreihe bei 20° C liegen die Aufnahmegeschwindigkeiten in den Ruhe- und Arbeitsmuskeln etwa 20mal höher als bei 0° C. Hier wurden sowohl die Ruhe- als auch die Arbeitsmuskeln bei 20° C zunächst ohne Reizung für 30 min in den radioaktiven Lösungen inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden dann die Ruhemuskeln ohne Reizung in flüssigem Stickstoff eingefroren, während die Arbeitsmuskeln vor dem Einfrieren noch einen Tetanus von 30 sec Dauer (Frequenz 12/sec) ausführten. Abb. 2 zeigt, daß auch diese intensive Reizung am Ende der Inkubationszeit keine dramatischen Effekte auf die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen besitzt. Die einzige Veränderung, die regelmäßig nach 30 sec Tetanus bei 20° C zu beobachten war, bestand in einem Anstieg der spezifischen Aktivität des β-Phosphors von ATP. Wesentlich ist, daß die Differenzen zwischen der spezifischen Aktivität des γ-Phosphors von ATP und des Kreatinphosphors auch in den Arbeitsmuskeln bestehenbleiben, obwohl ein Großteil (etwa 8 μmol/g Muskeln) des vorhandenen Kreatinphosphats während der Tätigkeit zerfiel. Nach der Lohmannschen Theorie soll Kreatinphosphat nur unter Übertragung seines Phosphatrestes auf ADP oder AMP gespalten werden können

(Lohmann, 1934). Es wäre daher zu erwarten, daß bei jedem stärkeren Abbau von Kreatinphosphat zumindest der γ-Phosphor von ATP — entsprechend seiner mutmaßlichen Herkunft — die spezifische Aktivität des Kreatinphosphors annehmen müßte. Auch dieses ist jedoch nicht der Fall. Die Versuche sind noch nicht ganz abgeschlossen; sie zeigen aber, daß bisher im lebenden Muskel auch mit der sehr empfindlichen Isotopenmethodik kein Anhaltspunkt zu finden war, welcher die Hypothese von einem „explosionsartigen" ATP-Zerfall im Kontraktions-

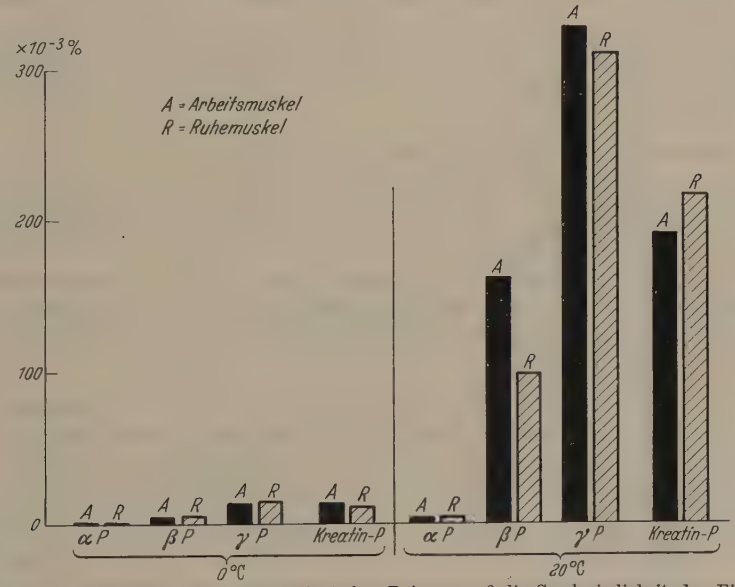


Abb. 2. Einfluß der Temperatur und elektrischen Reizung auf die Geschwindigkeit des Einbaus von $^{32}PO_4$ in die ATP- und Kreatinphosphat-Fraktion bei 30 min Aufenthalt der Muskeln in $^{32}PO_4$-Ringer-Lösung. Spezifische Aktivität ausgedrückt in Prozent der spezifischen Aktivität des extracellulären PO_4

augenblick stützen könnte. Der lebende Muskel reagiert offenbar anders als verschiedene contractile Präparate; dies zeigt sich auch darin, daß Mikroinjektion von ATP ins Innere intakter Muskelfasern nach neuen Befunden von Falk u. Gerard (1954) keine Verkürzung zur Folge hat. A. V. Hill hat schon 1950 betont: „There is no direct evidence that the breakdown of ATP ever occurs in living muscle except under conditions of extrem fatigue verging on rigor." „No certain evidence exists that any of the chemical changes at present known or believed to take place as a result of muscular activity occurs otherwise than in recovery." Zweifellos hat diese Reserve gegenüber der ATP-Theorie durch die mitgeteilten Ergebnisse aus letzter Zeit noch weiter an Berechtigung gewonnen.

Die Situation, in der sich die Lehre von der Erregung und Kontraktion des Muskels gegenwärtig befindet, ist also ziemlich kritisch. Manches erinnert an die Situation um 1930, als die Milchsäure-Theorie der Kontraktion in einen nicht zu überbrückenden Gegensatz zu den physiologischen Tatsachen geriet. Es ist noch nicht klar, welches neue Bild sich in den nächsten Jahren ergeben wird, doch darf man als sicher annehmen, daß jede neue theoretische Konzeption den Kalium-Natrium-Austausch bzw. die elektrischen Phänomene stärker als bisher in Rechnung stellen muß. Es wäre nicht überraschend, wenn die anfangs erwähnte Grundvorstellung von Overton aus dem Jahre 1902 (zusammen mit der Betheschen Theorie einer aktiven Erschlaffung aus dem Jahre 1911) zum Kristallisationspunkt für zukünftige Kontraktionstheorien würde.

Zusammengefaßt läßt sich folgendes sagen:

1. Der Primärvorgang bei der Muskelerregung und Kontraktion ist der Austausch von K^+ und Na^+ in Richtung des Diffusionsgefälles. Die motorischen Zustandsänderungen der Fasern gehen diesen Kationenbewegungen bzw. den dadurch verursachten elektrischen Ladungsänderungen gewöhnlich eng parallel: Depolarisation der Membran führt zur Verkürzung, bei der elektrischen Wiederaufladung strecken sich die Fasern wieder in die Länge.

2. Den restitutiven Stoffwechselprozessen fällt die Aufgabe zu, Na^+ immer wieder zu eliminieren und K^+ ins Faserinnere zurückzuresorbieren. Dadurch wird das Ruhepotential nach der Tätigkeit regeneriert. Vieles spricht dafür, daß die Umsetzungen von energiereichem Phosphat besondere Funktionen im Dienste des aktiven Kationentransports zu erfüllen haben.

3. Der lebende Muskel bietet keinen Anhaltspunkt für die Annahme, daß zwischen das elektrophysiologische Phänomen der Depolarisation und den mechanischen Akt der Kontraktion eine Spaltung von ATP obligatorisch eingeschaltet ist. Stattdessen rückt die Alternativfrage in den Vordergrund, ob nicht der gestreckte, längsorientierte Zustand der contractilen Elemente ein Zustand höherer Ordnung ist, der durch die elektrische Aufladung der ruhenden Membran erzwungen wird. Die contractilen Elemente würden dann spontan in den weniger geordneten, verkürzten Zustand zurückkehren, sobald sich die Membran elektrisch entlädt.

Literatur

Berenblum, I., and E. Chain: An improved method for the colorimetric determination of phosphates. Biochemic. J. **32**, 295—298 (1938). — Bernstein, J.: Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Pflügers Arch. **92**, 521—562 (1902). — Bethe, A.: Die Dauerverkürzung der Muskeln. Pflügers Arch. **142**, 291—336 (1911). — Allgemeine Physiologie. Berlin: Springer 1952. — Biedermann, W.: Elektrophysiologie. Jena 1895. — Brecht, K., u. W. Weise: Zum

Wirkungsmechanismus des Acetylcholins am M. rectus abdominis des Frosches. Pflügers Arch. **258**, 72—86. (1953). — Britton Chance: persönl. Mitteilung (1955). — Bülbring, E.: Correlation between membrane potential, spike discharge and tension in smooth muscle. Brit. J. Physiol. **128**, 200—221 (1955). — Calkins, E., I. M. Taylor and A. B. Hastings: Potassium exchange in the isolated rat diaphragm; effect of anoxia and cold. Amer. J. Physiol. **177**, 211—218 (1954). — Cicardo, V. H., et J. L. Moglia: Liberation du potassium musculaire par l'acetylcholine. Arch. internat. Physiol. **50**, 268—276 (1940). — Connelly, C. M., and Britton Chance: Kinetics of reduced pyridine nucleotides in stimulated frog muscle and nerve. Federat. Proc. **13**, No. 1 (1954). — Davies, R. E., A. Fleckenstein und J. Janke: Unveröffentlicht. Vorläufige Mitteilung: A. Fleckenstein, Muskelkontraktion ohne ATP-Zerfall. Verh.-ber. 21. Tagg Dtsch. Physiol. Ges. in Heidelberg 18. Sept. 1954. — Davies, R. E., and H. A. Krebs: Biochemical aspects of the transport of ions by nervous tissue. Biochem. Soc. Symposia 8, 77—92 (1952). — Dubuisson, M.: Muscular contraction. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1954. — Eggleston, L. V., and R. Hems: Separation of adenosine phosphates by paper chromatography and the equilibrium constant of the myokinase system. Biochemic. J. **52**, 156—160 (1952). — Eichholtz, F.: Die Anwendung von Novocain in der Inneren Medizin. Klin. Wschr. **1950**, 761—764. — Falk, G., and R. W. Gerard: Effect of micro-injected salts and ATP on the membrane potential and mechanical response of muscle. J. Cellul. a. Comp. Physiol. **43**, 393—403 (1954). — Fleckenstein, A.: Beitrag zum Mechanismus der Muskelkontraktion und zur Entstehung der Aktionsströme. Pflügers Arch. **246**, 411—427 (1942). — Über den primären Energiespeicher der Muskelkontraktion. Pflügers Arch. **250**, 643—666 (1947). — Die periphere Schmerzauslösung und Schmerzausschaltung. Frankfurt a. M.: Dr. Dietrich Steinkopff 1950a. — Über den Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetica. Klin. Wschr. **1950**b, 452—453. — Verh. Dtsch. Pharmakol. Ges. 17. Tagg Bad Nauheim April 1950. Kaliumsensibilisatoren. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 54—63 (1950c). — Elektrophysiologische Studien zum Mechanismus des Nervenblocks durch Schmerzstoffe und Lokalanaesthetica. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 416—432 (1950d). — Der Kalium-Natrium-Austausch als Energieprinzip in Muskel und Nerv. Berlin: Springer 1955. — Fleckenstein, A., u. E. Gerlach: Papierchromatographische Trennung von Adenosintriphosphat Adenosindiphosphat und anderen Phosphorverbindungen bei Säugetier- und Taubenerythrocyten verschiedenen K^+-Gehalts. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 531—548 (1953). — Fleckenstein, A., u. A. Hardt: Der Wirkungsmechanismus der Lokalanaesthetica und Antihistaminkörper — ein Permeabilitätsproblem. Klin. Wschr. **1949**, 360—363. — Fleckenstein, A., u. J. Janke: Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphor-Verbindungen im kontrahierten und erschlafften Froschmuskel. Pflügers Arch. **258**, 177—199 (1953). — Fleckenstein, A., J. Janke et R. E. Davies: Phosphate compounds and muscle contraction. Résumés des Communications 3. Congr. Internat. Biochimie, Brüssel, S. 79 (1955). — Fleckenstein, A., J. Janke, R. E. Davies and H. A. Krebs: Chemistry of muscle contraction. Contraction of muscle without fission of adenosine triphosphate or creatine phosphate. Nature (Lond.) **174**, 1081—1083 (1954). — Fleckenstein, A., J. Janke u. M. Elke: Papierchromatographische Trennung von Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und von anderen Phosphorverbindungen bei der Coffein-Kontraktur des Frosch- und Kröten-Rectus. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 404—417 (1954). — Fleckenstein, A., J. Janke, G. Lechner u. G. Bauer: Zerfällt Adenosintriphosphat bei der Muskelkontraktion? Pflügers Arch. **259**, 246—266 (1954). — Fleckenstein, A., J. Janke, R. Kruse u. G. Lechner: Über das Verhalten von Adenosintriphosphat,

Adenosindiphosphat und anderen Phosphorsäure-Estern bei der Kontraktur des Froschrectus durch Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 465—475 (1955). — Fleckenstein, A., E. Wagner u. K. H. Göggel: Weitere Untersuchungen über die Abhängigkeit der Muskellänge vom Membran-Potential. Der Wirkungsmechanismus kontrakturverhütender Lokalanästhetica. Pflügers Arch. **253**, 38—54 (1950). — Gardos, G.: Akkumulation der Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen. Acta Physiol. Acad. Sci. Hungaricae **6**, 191—199 (1954). — Gerlach, E.: Einfluß von Stoffwechselgiften auf die Phosphorsäureester und den $^{32}PO_4$-Turnover in Menschen- und Vogel-Erythrocyten. Pharmakologenkongr. 5. Sept. 1955 in Graz; vgl. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 128—129 (1956). — Ginzel, K. H., H. Klupp u. G. Werner: Die Wirkungsweise einiger γ, ω-bis-quaternärer Ammoniumverbindungen an der Skeletmuskulatur. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 103—118 (1952). — Hanes, C. S., and F. A. Isherwood: Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. Nature (Lond.) **164**, 1107—1112 (1949). — Hardt, A., u. A. Fleckenstein: Über die Kaliumabgabe des Froschmuskels bei Einwirkung kontrakturerzeugender Stoffe und die Hemmung der Kaliumabgabe durch kontrakturverhütende Lokalanästhetica. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **207**, 39—54 (1949). — Henze, M.: Der chemische Demarcationsstrom in toxikologischer Beziehung. Pflügers Arch. **92**, 451—472 (1902). — Hill, A. V.: A discussion on muscular contraction and relaxation: their physical and chemical basis. Proc. Roy. Soc. Lond. **137**, 43 (1950). — Hodgkin, A. L., and R. D. Keynes: Metabolic inhibitors and sodium movements in giant axons. Brit. J. Physiol. **120**, 45 P—46 P (1952). — Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. Brit. J. Physiol. **120**, 28—60 (1955). — Kitzinger, C., u. T. Benzinger: Wärmetönung der Adenosintriphosphorsäure-Spaltung. Z. Naturforsch. **10 B**, 375—382 (1955). — Klupp, H., u. O. Kraupp unter Mitarbeit von N. Honetz, W. Kobinger u. M. Loudon: Über die Freisetzung von Kalium aus der Muskulatur unter Einwirkung einiger Muskelrelaxantien. Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 340—354 (1954). — Kraupp, O.: G. Werner, W. Kobinger und H. Stormann: Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch intraarterielle Injektionen von Acetylcholin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 301—318 (1955). — Krüger, P.: Tetanus und Tonus der quergestreiften Skeletmuskeln der Wirbeltiere und des Menschen. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1952. — Kuffler, St. W.: The relation of electric potential changes to contracture in sceletal muscle. J. of Neurophysiol. **9**, 367—377 (1946). — Kuffler, St. W., and E. M. Vaughan Williams: Properties of the slow sceletal muscle fibres of the frog. Brit. J. Physiol. **121**, 318—340 (1953a). — Small-nerve junctional potentials. The distribution of small motor nerves to frog sceletal muscle, and the membrane characteristics of the fibers they innervate. Brit. J. Physiol. **121**, 289—317 (1953b). — Kuhn, W., u. B. Hargitay: Muskelähnliche Kontraktion und Dehnung von Netzwerken polyvalenter Fadenmolekülionen. Experientia (Basel) **7**, 1—11 (1951a). — Muskelähnliche Arbeitsleistung künstlicher hochpolymerer Stoffe. Z. f. Elektrochem. u. angew. physik. Chem. **55**, 490—505 (1951b). — Lembeck, F., u. R. Strobach: Kaliumabgabe aus glatter Muskulatur. Pharmakologenkongr. 5. Sept. 1955 in Graz; vgl. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 130—131 (1956). — Leupin, E., u. F. Verzár: Kalium- und Kohlenhydrat-Stoffwechsel des überlebenden Muskels. Helvet. physiol. Acta **8**, C27—C30 (1949). — Levinsky, N. G., and W. H. Sawyer: Relation of metabolism of frog skin to cellular integrity and electrolyte transfer. J. Gen. Physiol. **36**, 607—615 (1953). — Lohmann, K.: Über das Vorkommen und den Umsatz von Pyrophosphat in Zellen. III. Das physiologische Verhalten des Pyrophosphats. Biochem. Z. **203**, 172—207 (1928). — Zerfällt Lactacidogen

(Hexosemonophosphorsäure) bei der Muskelkontraktion? Biochem. Z. **227**, 39—50 (1930). — Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure; zugleich ein Beitrag zum Chemismus der Muskelkontraktion. Biochem. Z. **271**, 264—277 (1934). — Loomis, W. F., and F. Lipmann: Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. J. of Biol. Chem. **173**, 807—808 (1948). —Maizels, M: Cation transport in chicken erythrocytes. Brit. J. Physiol **125**, 263—277 (1954). — Mommaerts, W. F. H. M.: Is adenosine triphosphate broken down during a single muscle twitch? Nature (Lond.) **174**, 1083—1084 (1954). — Mudge, G. H.: Electrolyte and water metabolism of rabbit kidney slices: effect of metabolic inhibitors. Amer. J. Physiol. **167**, 206—223 (1951). — Nachmansohn, D., R. T. Cox, C. W. Coates and A. L. Machado: Action potential and enzyme activity in the electric organ of Electrophorus electricus. II. Phosphocreatine as energy source of action potential. J. of Neurophysiol. **6**, 383—396 (1943). — Overton, E.: Über die Unentbehrlichkeit von Natrium- (oder Lithium-) Ionen für den Contractionsact des Muskels. Pflügers Arch. **92**, 346—386 (1902). — Reichel, H.: Private Mitteilung (1955). — Reiter, M.: Wirkung kontraktionsverbessernder Maßnahmen auf den Alkaligehalt des isolierten Herzmuskels. Pharmakologenkongr. 5. Sept. 1955 in Graz; vgl. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 133—134 (1956). — Schaefer, H.: Elektrophysiologie, Bd. I. Wien: Franz Deuticke 1940. — Schmiedeberg, O.: Über elastische Verkürzung und aktive Erschlaffung lebender Muskeln. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **82**, 159—176 (1917). — Straub, F. B.: Über die Akkumulation der Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen. Acta physiol. Acad. Sci. Hungaric. **4**, 235—240 (1953). — Terner, C., L. V. Eggleston and H. A. Krebs: The role of glutamic acid in the transport of potassium in brain and retina. Biochemic. J. **47**, 139—149 (1950). — Weber, H. H.: Das kontraktile System von Muskeln und Zellen. Rapports, 3. Congr. Internat. Biochimie, S. 81—88. Brüssel 1955. — Whittam, R., and R. E. Davies: Active transport of water, sodium, potassium and α-oxoglutarate by kidney-cortex slices. Biochemic. J. **55**, 880—888 (1953). — Wilde, W. S., and J. M. O'Brien: The time relation between potassium (K^{42}) outflux, action potential, and the contraction phase of heart muscle as revealed by the effluogram. Abstracts XIX. International. Physiol. Congress Montreal, S. 889—890 (1953).

Diskussion

Ebbecke (Bonn): Hinweis auf die Kompressionsverkürzung, bei der die elektrischen und chemischen Verhältnisse noch nicht recht klar sind.

Muscholl (Mainz): Depolarisation, K-Abgabe und Verkürzung des Muskels sind nicht prinzipiell miteinander Verknüpft, wie Ergebnisse verschiedener Autoren zeigen: Taylor[1] sah bei intracellulärer Messung keine Änderung des Membranpotentials während des mechanischen Teils der Zuckung des Froschmuskels. Die kathodische und postanodische Kontraktur geht ohne Depolarisation einher. Coffein bewirkt erst nach Erreichen des Kontrakturmaximums einen Membranpotentialabfall. Der durch Monojodessigsäure hervorgerufene Rigor ist trotz einer K-Abgabe des Muskels nicht von einer Depolarisation begleitet[2]. Auch Ryanodin führt zur Kontraktur ohne Veränderung des Membranpotentials[3].

[1] J. Cellul. a. Comp. Physiol. **42**, 103, (1953.

[2] Liu, Hsu and Feng: Nature (Lond.) **162**, 962, (1948).

[3] Jenerick and Gerard: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **42**, 79, (1953).

D. W. Woolley (New York): Arzneimittel und Antimetaboliten*

Mit 4 Textabbildungen

Ich möchte Ihnen heute ein wenig über Antimetaboliten erzählen und Ihnen zeigen, daß sie beinahe eine Revolution in der Pharmakologie hervorrufen. Um diese Veränderung erfassen zu können, wollen wir uns zunächst einmal den gewöhnlichen Gang der Entwicklung neuer Arzneimittel vergegenwärtigen. In der Vergangenheit sind sie fast ausschließlich durch Zufall gefunden worden. Das erste Glied einer Serie wurde in irgendeiner Pflanze oder bei der Erprobung synthetischer Chemikalien entdeckt. Aber stets wurde das erste Glied durch Zufall gefunden. Nachher konnte man durch Synthese wirksamere Glieder mit einer Struktur auffinden, die dem ersten Gliede ähnlich war.

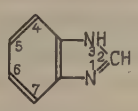
Ein gutes Beispiel für diese Tatsache ist das Atropin, welches durch Zufall als pharmakologisch wirksam entdeckt wurde. Bessere spasmolytische Pharmaka wurden dann dadurch abgeleitet, daß geeignete Veränderungen an der Struktur des Atropins vorgenommen wurden. Was ich Ihnen heute zeigen möchte ist, daß es heutzutage möglich wird, durch Verwendung der Kenntnis der Antimetaboliten das erste Glied einer Serie vorauszusagen und herzustellen. Diese Idee wurde vor ungefähr 11 Jahren angeschnitten, und in der bisher vergangenen Zeit ist sie durch die Entwicklung einiger neuer Klassen von Arzneimitteln bestätigt worden, von denen einige jetzt das Stadium der klinischen Anwendung bei der Behandlung gewisser Krankheiten erreicht haben. Wir wollen uns daher einige Grundprinzipien der Antimetaboliten vergegenwärtigen und ein paar Beispiele untersuchen. Einige von diesen Beispielen haben historische Bedeutung, aber andere werden sich mit Arbeiten beschäftigen, die gegenwärtig laufen.

Die Idee eines Antimetaboliten kann am besten mit der Beschreibung des *Pyrithiamins* illustriert werden. Das war einer der früh entdeckten Antimetaboliten und einer der ersten der im Tierversuch verwendet wurde. Nach der Entdeckung von Woods, daß *Sulfanilamid* seine antibakterielle und chemotherapeutische Wirkung der Tatsache verdankt, daß es ein Antagonist eines notwendigen Wachstumsfaktors, nämlich der *p-Aminobenzoesäure* ist, welcher dieses Arzneimittel chemisch ähnlich war, wurden nun Versuche unternommen, um festzustellen, ob andere brauchbare Arzneimittel durch Herstellung struktureller Analoga von essentiellen Wachstumsfaktoren gewonnen werden könnten. Einige von diesen haben sich auch tatsächlich als spezifische Hemmkörper für das Bakterienwachstum in vitro erwiesen. Aber, was wichtiger war: Diese strukturellen Analoge der Vitamine, diese Antimetaboliten, hatten —

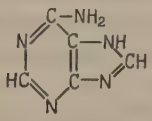
* Vortrag in englischer Sprache gehalten

wie sich herausstellte — spezifische und weitgehende pharmakologische Wirkung auf höhere Tiere und auch auf Mikroorganismen.

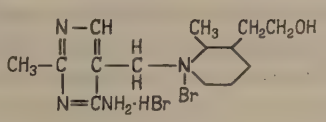
Formel 1 wird Ihnen die chemische Struktur des Vitamins B_1 (*Thiamin*) zeigen. Wenn man den Schwefel in diesem Vitamin durch 2 C-Atome ersetzt, gelangt man zum *Pyrithiamin*. Dieses nahe strukturelle Analogon des Thiamin ist ein Antimetabolit des Vitamins. Wenn man Tieren Pyrithiamin verfüttert, dann entwickeln sie die typischen Zeichen



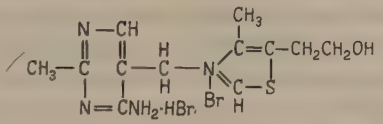
Benzimidazol



Adenin



Pyrithiamin



Thiamin

Formel 1

des Vitamin B_1-Mangels. Diese charakteristischen Zeichen können entweder verhindert oder behandelt werden, wenn man zusätzlich Thiamin verfüttert. Versuchsergebnisse, die diesen Punkt illustrieren, werden in Tab. 1 gezeigt. Die Veränderungen in der Wachstumsgeschwindigkeit

Tabelle 1. *Reaktion der Maus auf verschiedene Dosen von Thiamin und Pyrithiamin*

Pyrithiamin γ/Tag	Thiamin γ/Tag	Tiere mit Thiamin-Mangelerscheinungen %	Gewichtsabnahme g/Woche
0	1,6	0	+ 3,0
600	1,6	100	— 0,2
300	1,6	100	+ 1,9
100	1,6	100	+ 2,5
100	2,0	75	+ 2,4
50	2,0	0	+ 3,5
600	61,6	0	+ 3,1
2000	60,0	0	+ 3.6

sind ein Indicator für die anderen Zeichen des Vitamin B_1-Mangels, welcher sich entwickelt. Beachten Sie, daß die Toxizität des Pyrithiamin nicht eine absolute Quantität ist, sondern daß sie vielmehr von der Thiaminaufnahme der Mäuse abhängig ist. Je mehr Thiamin sie bekommen, desto mehr Pyrithiamin muß angewendet werden, um die

Zeichen des B_1-Mangels hervorzurufen. Keine andere Substanz außer Thiamin kann die Veränderungen heilen, die durch Pyrithiamin hervorgerufen sind.

Wir sehen daher an diesem Beispiel, daß man die spezifischen Zeichen des Thiaminmangels nur durch Verfütterung einer Verbindung herbeiführen kann, welche nahe strukturelle Verwandtschaft zum Vitamin besitzt. Die pharmakologischen Einwirkungen, die so hervorgerufen werden, können durch Vitamin B_1 entweder verhütet oder geheilt werden. Man hat daher in Pyrithiamin ein spezifisches Mittel, um jene Veränderung in einem Tier herbeizuführen, welche auch mit Vitamin B_1-Mangel erzeugt werden.

Diese Art der Wirkung wurde mit einer großen Zahl von im Stoffwechsel notwendigen Substanzen durchgeführt. So gibt es Antimetaboliten gegen die meisten Vitamine, gegen viele Hormone, Aminosäuren, Purine und Pyrimidine und einige andere Verbindungen, welche bei allen Arten von Lebewesen eine vitale Rolle spielen. Die Fähigkeit, vorauszusagen und Antimetaboliten herzustellen ist also eine grundlegende Erkenntnis.

Viele biochemische Arbeiten haben gezeigt, daß die Antimetaboliten in folgender Weise funktionieren: Jedes Vitamin oder jeder andere notwendige Stoffwechselkörper greift in eine spezifische Enzymreaktion ein, um seine Wirkung entfalten zu können. Der Metabolit ist das Substrat für sein spezifisches Enzym und verbindet sich mit diesem Enzym in ähnlicher Weise wie ein Schlüssel in ein Schloß paßt (Formel 2). Wenn

Substrat + Enzym ⟷ Komplex
Komplex ⟷ Reaktionsprodukt + Enzym
Antimetabolit + Enzym ⟷ inaktiver Komplex
Inaktiver Komplex ⟷ kein Reaktionsprodukt

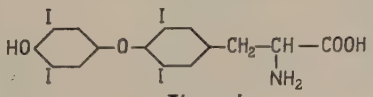
Formel 2

einmal der Schlüssel eingeführt ist, dann kann man das Schloß aufschließen und die spezielle Tür zum Stoffwechsel kann so geöffnet werden. Weil der Antimetabolit in seiner Form dem Metaboliten gleicht, kann er auch in dieses Schloß eingeführt werden, aber weil er von dem richtigen Schlüssel etwas abweicht, kann die Tür nicht aufgeschlossen werden. Tatsächlich ist auch der richtige Schlüssel dann nicht imstande, in das Schloß einzudringen. Auf diese Weise wird die Tür nicht geöffnet und der vitale Vorgang wird unterbrochen. Das Problem, Antimetaboliten herzustellen, besteht daher darin, ein Molekül zu erzeugen, welches so geformt ist, daß es dem Schlüssel zu den Türen des Stoffwechsels der Tiere ähnelt, so daß das Schlüsselloch blockiert werden kann.

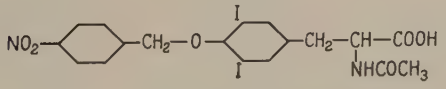
Die Bedeutung aller dieser Dinge für die Entdeckung neuer Klassen von Arzneimitteln ist nun folgende: Man kennt viele der Wirkungen,

die bei Tieren durch spezifischen Mangel entstehen. Zum Beispiel sind die Symptome gut bekannt, die durch Entfernung der Schilddrüse hervorgerufen werden. Diese Symptome sind das Resultat eines Thyroxinmangels. In ähnlicher Weise ist bekannt, was bei Mangel verschiedener anderer Hormone geschieht. Wir haben bereits einige Symptome besprochen, die durch einen Mangel des einen oder des anderen Vitamins in der Diät hervorgerufen werden. Man kennt daher weitgehend die Veränderungen im Tier, welche durch einen Mangel von jedem notwendigen Metaboliten entstehen. Die Antimetaboliten versehen uns nun mit spezifischen Arzneimitteln, welche gerade diese Veränderungen hervorrufen können. Einige von diesen Veränderungen sind in hohem Grade für therapeutische oder experimentelle Zwecke wünschenswert. Mit den Antimetaboliten können wir solche pharmakologische Wirkungen hervorrufen.

Ein früher Beweis für diese Tatsache wurde mit den *Antimetaboliten des Thyroxins* gewonnen. Sie wissen alle, daß ein Überschuß an Thyroxin beim Menschen zu der klinisch wohl definierten Erkrankung, nämlich der Thyreotoxikose führt. Wir können also einen Antimetaboliten des Thyroxins herstellen, um diese Erkrankung zu beherrschen. Solch ein Antimetabolit wird in Formel 3 gezeigt. Die Originalversuche wurden



Thyroxin



p-Nitrobenzyläther des N-Acetyldijodtyrosin

Formel 3

mit Kaulquappen durchgeführt und die Resultate werden in Abb. 1 gezeigt. Dieses Analoge war also das erste Glied einer neuen Klasse von Arzneimitteln, nämlich derjenigen, welche die Wirkungen des bereits gebildeten Thyroxins antagonisieren können. Der spezielle Antimetabolit, der hier gezeigt wird, ist klinisch nicht verwendet worden; aber in England wurde ein anderes Glied dieser Serie hergestellt ind erwies sich bei Thyreotoxikose als klinisch wirksam. Es mag sein, daß derartige Stoffe ihren Platz in der praktischen Medizin finden.

Ein besser bekanntes Beispiel für Antimetaboliten, welche eine neue Klasse von Arzneimitteln darstellen, sind die gegen *Folsäure* gerichteten Mittel. Ungefähr 2 Jahre nach der Veröffentlichung der Ideen, die eben beschrieben wurden, entwickelte man diese gegen Folsäure gerichteten

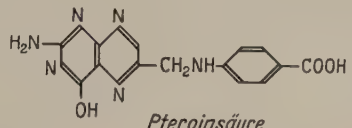
Stoffe als eine direkte Folge solcher Vorstellungen. So war es z. B. bekannt, daß ein Mangel an Folsäure (Formel 4) zu einer Leukopenie führt und es war klar, daß eine Verringerung der Leukocytenzahl bei einer Krankheit wie Leukämie wünschenswert sein würde. Infolgedessen wurden Antimetaboliten gegen Folsäure entwickelt in der Annahme, daß sie Arzneimittel darstellen würden, welche die Zahl der Leukocyten herabdrücken könnten. Einige von diesen haben sich als nützliche Therapeutica erwiesen.

Unbehandeltes Tier Thyroxin Thyroxin-Analoges

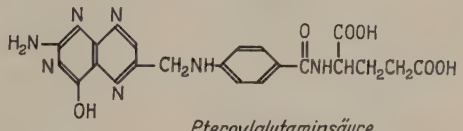
Abb. 1. Versuche an Kaulquappen

Die aktivste Verbindung, nämlich Aminopterin, sehen Sie in Formel 5. Sie erkennen die nahe strukturelle Verwandtschaft mit Folsäure. *Aminopterin* verursacht eine Remission der Leukämie bei Kindern bei ungefähr der Hälfte der Fälle, aber unglücklicherweise ist diese Remission nicht von Dauer. Ungefähr nach einem Jahr schreitet die Krankheit wieder fort. Dieser sehr beschränkte Erfolg mit den Antifolsäurestoffen ist aber ein großer Ansporn für die Arbeit mit Antimetaboliten als wertvollen Heilmitteln gewesen und hat zur Erprobung vieler Antimetaboliten der Purine bei der Behandlung von Carcinomen geführt. Nach meiner Meinung sind wir von einer befriedigenden Entwicklung dieser Idee noch weit entfernt. Die bestehenden Antimetaboliten dieser Art sind

toxisch für Tiere und ihre Anwendung hängt daher von der unterschiedlichen Toxicität zwischen Wirtsorganismus und Neoplasma ab. Bevor wir auf einen Erfolg rechnen können, müßten wir herausbekommen, wie man selektiv wirkende Substanzen herstellen kann, die den Wirt nicht ungebührlich schädigen. Unsere eigenen Bemühungen haben sich in den



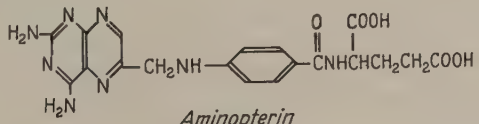
Pteroinsäure



Pteroylglutaminsäure

Formel 4

letzten 8 Jahren mit diesem Problem beschäftigt und wir haben das Gefühl, daß doch ein Fortschritt gemacht worden ist. Nachdem aber dieses Thema von dem gegenwärtigen etwas abweicht, will ich es nicht weiter verfolgen.



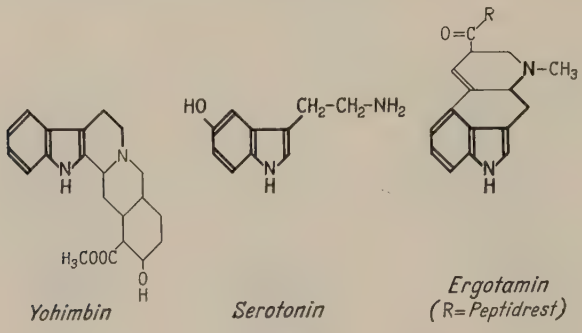
Aminopterin

Formel 5

Wir wollen also zu dem Hauptthema zurückkehren, welches die Vorhersage und die Herstellung neuer Arzneimittel beinhaltet und einige neuere Arbeiten besprechen. Wie viele von Ihnen wissen, ist kürzlich ein neues Hormon entdeckt worden. Es handelt sich um das *Serotonin* oder *Enteramin* oder *Oxytryptamin*, dessen Konstitution in Formel 6 zu sehen ist. Es wurde in den Arbeiten von Rapport, Green und Page in den Vereinigten Staaten und von Erspamer in Italien identifiziert und isoliert. Diese Verbindung kommt in den Blutplättchen, ferner in der Magen- und Darmschleimhaut und im Nervensystem vor. Es verursacht Kontraktion verschiedener glatter Muskel und beeinflußt gewisse Funktionen des Nervensystems. In dieser Beziehung hat es eine gewisse Verwandtschaft mit Adrenalin, welches ebenso glatte Muskeln kontrahiert und ebenfalls bei der Nervenfunktion eine gewisse Rolle spielt.

Serotonin ist die vasoconstrictorische Substanz, deren Bildung bei der Blutgerinnung seit langer Zeit bekannt war. Beim Gerinnungsprozeß

wird es aus den Plättchen frei und erscheint im Serum. Die muskelkontrahierende Wirkung, die besonders auf die glatten Muskeln in der Gefäßwand ausgeübt wird, ist die Ursache seiner blutdrucksteigernden Wirkung bei Injektionen am Hund oder am Menschen. Außerdem verursacht es Kontraktionen des Darms und des Uterus und hat auch Wirkungen auf das Herz und auf die Lungen.



Formel 6

Wenn wir nach den Erfahrungen mit Adrenalin, mit Acetylcholin und anderen Hormonen urteilen können, wird man wahrscheinlich Krankheiten finden, die auf einem Zuviel an Serotonin beruhen, genau so wie es Krankheiten gibt, die auf einem Überschuß an anderen Hormonen beruhen. Weil es eine der Eigenschaften des Serotonins ist, den Blutdruck zu erhöhen, haben wir als Arbeitshypothese angenommen, daß einige Arten der essentiellen Hypertonie möglicherweise auf Störungen des Serotoninstoffwechsels beruhen können. Zum Teil wurden aus diesem Grund nun auch Versuche gemacht, starke und spezifische Antimetaboliten gegen Serotonin zu entwickeln, die einem solchen Überschuß entgegenwirken könnten.

Besonders zwei Arten von Tests wurden bei dieser Arbeit verwendet. Bei dem einen wurden isolierte Rattenuteri durch Serotonin kontrahiert und die Kontraktion wurde dann durch Antiserotonin gehemmt. Bei der

Tabelle 2. *Antagonismus von Serotonin gegen 2,3-Dimethyl-5-aminoindol-Testung an Arterienringen*

Serotonin γ/cm³	Analogon γ/cm³	Abnahme der Hauptachse %
0	0	0
0,2	0	18
0,2	0	20
0,2	4	18
0,2	10	9
0,2	20	4
0	20	0

zweiten Testmethode wurde Serotonin Hunden intravenös injiziert und der Blutdruckanstieg gemessen. Die Hunde wurden dann mit Antiserotonin behandelt und danach wurde wieder Serotonin injiziert. Ein wirksames Mittel verhindert dann den Anstieg des arteriellen Blutdruckes. Diese Methoden, besonders diejenigen an isolierten Organen in vitro, erlauben auch quantitative Studien über die Wirkung dieser neuen Klasse von Arzneimitteln. Einige Beispiele werden in Tab. 2 gezeigt.

Die Abb. 2 zeigt eine Dosis-Wirkungskurve, welche die kontrahierende Wirkung des Serotonin auf isolierte Abschnitte der A. carotis

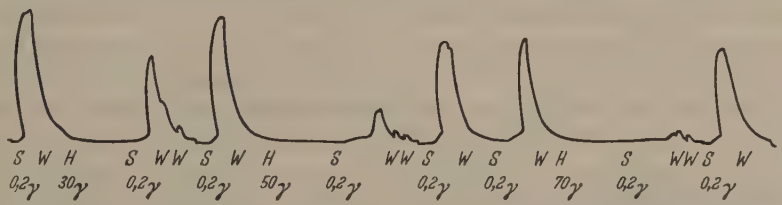
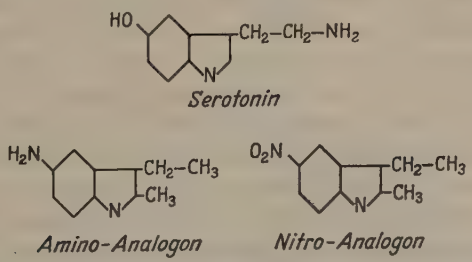


Abb. 2. Versuche an isolierten Carotisringen des Schafes. *S* Serotonin, *W* Auswaschen, *H* Harmin

zeigt. Es werden ringförmige Stücke aus der A. carotis des Schafes in Ringer-Lösung aufgehängt und die inneren Durchmesser, also der Durchmesser des Arterienlumens mit Hilfe des Mikroskopes ausgemessen. Dann werden einer Serie solcher Präparate steigende Dosen von Serotonin zugesetzt und wieder die Durchmesser bestimmt. Die Muskelkontraktion, welche das Serotonin verursacht, verkleinert den Durchmesser. Wenn nun ein Antimetabolit von Serotonin dem Bad zugesetzt wird, welches einen voll kontrahierten Arterienring enthält, so erschlafft die Muskulatur und der Ring dehnt sich aus.

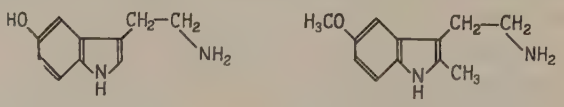


Formel 7

Formel 7 zeigt die chemische Struktur des ersten künstlich hergestellten *Antiserotonin*. Es war dies das Amino-analoge, welches die kontrahierende Wirkung des Serotonin auf Arterienringe aufhebt. Die Aufhebung ist reversibel und kompetitiv.

Eine erhebliche Zahl von Antimetaboliten des Serotonin sind bisher von Dr. E. Shaw in unserem Laboratorium hergestellt worden und wir haben sie an isolierten Geweben in vitro und an Tieren in vivo ausgewertet. Die Zeit reicht nicht aus, um Ihnen über alle Einzelheiten dieser Substanzen oder auch nur über die hervorstechendsten Dinge, die sich aus diesen Studien ergeben haben, zu berichten. Es mag immerhin darauf hingewiesen werden, daß einiger dieser Antimetaboliten eine hohe Aktivität am isolierten Gewebe zeigen; doch sind sie nicht imstande, Hunde gegen die Blutdruckveränderungen zu schützen, welche durch Serotonin hervorgerufen werden. In dieser Beziehung gleichen die Antiserotonine den Antihistaminen und den Antiacetylcholinen. Auch in diesen anderen Gruppen von Heilmitteln gibt es viele, welche in vitro wirksam sind, in vivo dagegen weniger. Bei einigen Antiserotoninen, welche in vivo unwirksam sind, war es möglich, herauszubekommen, warum dies der Fall ist. Manchmal handelt es sich um eine zu rasche Zerstörung der Substanz, manchmal um eine Adsorption und folgende Inaktivierung durch die Globuline des Blutes. In vielen Fällen gibt es aber keine adäquate Erklärung.

Einer der aktivsten Antimetaboliten des Serotonin und zwar einer der sowohl in vitro als auch in vivo wirkt, ist das *2,5-Dimethylserotonin*. Die Struktur dieser Verbindung ist aus Formel 8 zu ersehen. Im Test



Serotonin *2,5-Dimethyl-Serotonin*

Formel 8

mit den Arterienringen hat diese Verbindung einen Hemmungsindex von 10. Das bedeutet, daß 10 Moleküle dieser Substanz die Wirkung eines Moleküls von Serotonin hemmen können. Es ist etwas weniger wirksam am isolierten Uterus, aber seine Wirksamkeit auch an diesem Präparat wird in Abb. 3 gezeigt. Es handelt sich hier um eine Kurve von einem isolierten Rattenuterushorn und Sie können die Art der Kontraktion erkennen, die durch Serotonin hervorgerufen wird. Wenn 2,5-Dimethylserotonin zum Bad hinzugefügt wird, sehen Sie, daß keine Kontraktion mehr auftritt und daß das Gewebe dann gegen Serotonin unempfindlich geworden ist. Wenn man nun den Antimetaboliten aus dem Präparat auswäscht oder wenn durch Zusatz von Serotonin seine Wirksamkeit aufgehoben wird, dann wird auch die Kontraktionsfähigkeit wiederhergestellt.

Die Resultate eines Experiments am Hund mit diesem Antimetaboliten werden in Abb. 4 gezeigt. Beachten Sie die Steigerung des arte-

riellen Druckes, die durch Serotonin allein hervorgerufen wird. Der Antimetabolit an und für sich verursacht eine gewisse Steigerung des Blutdruckes, aber Sie sehen, daß sich bei Steigerung der Dosis die Reaktion verringert. Nach jeder Injektion des Antimetaboliten wird die Wirkung von Serotonin auf das Tier getestet. Sie können sehen, daß bald ein

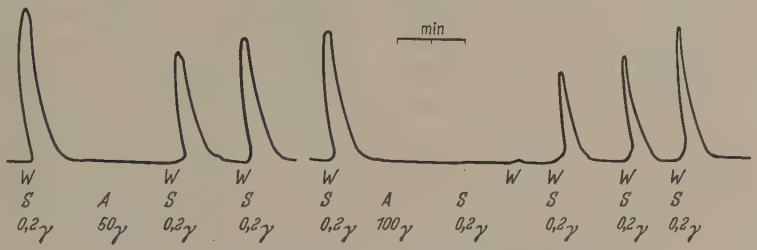


Abb. 3. Versuche am isolierten Uterus der Ratte
S Serotonin, *W* Auswaschen, *A* 2,5-Dimethyl-Serotonin

Punkt erreicht wird, bei welchem Serotonin keine Blutdrucksteigerung hervorruft; statt dessen wird sogar die Blutdruckkurve umgekehrt und die Injektion von Serotonin ruft nun nur einen tiefen Fall des arteriellen Druckes hervor. Bei derartigen Experimenten ist aber die Fähigkeit des Tieres, auf andere blutdrucksteigernde Substanzen wie Adrenalin zu

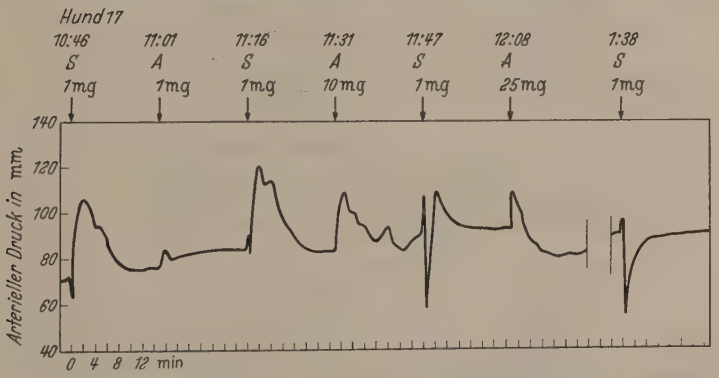


Abb. 4. Versuche am Blutdruck des Hundes. *S* Serotonin, *A* 2,5-Dimethyl-Serotonin

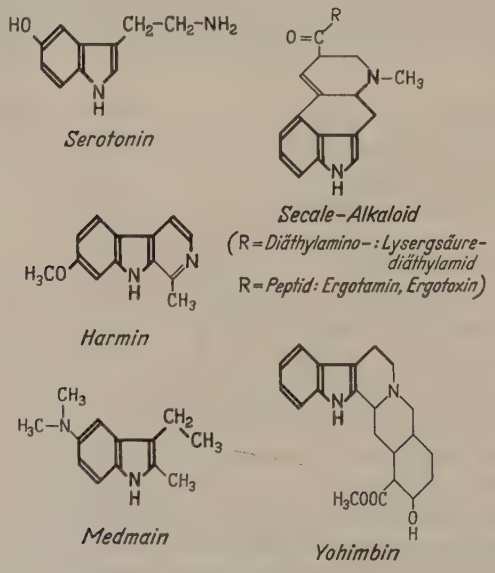
reagieren, noch voll erhalten. Tatsächlich ist die Wirkung einiger Antiserotonine derart spezifisch, daß der Hund noch auf Tryptamin, aber nicht mehr auf Serotonin anspricht. Sie werden sich daran erinnern, daß Tryptamin ein naher Verwandter des Serotonins ist, es handelt sich ja um Desoxyserotonin.

Soweit ist diese Arbeit bisher mit den Antimetaboliten des Serotonin in bezug auf den Blutdruck gediehen. Der nächste Schritt wird nun die klinische Erprobung einiger dieser Verbindungen einschließen. Dies ist

jedoch gerade erst in Bearbeitung. Wir haben das Gefühl, mit gutem Grund erwarten zu können, daß die Präparate einen Platz bei der Behandlung einiger Krankheiten finden werden.

Ich hoffe, daß Sie gesehen haben, wie es aus der Entwicklung dieser neuartigen Vorstellungen in der Pharmakologie jetzt möglich wird, die Struktur ganz neuer Klassen von Arzneimitteln vorherzusagen, und in vielen Fällen auch die pharmakologischen Eigenschaften dieser Verbindungen schon zu erkennen, bevor sie noch hergestellt wurden. In dem Maße, wie sich die neue Richtung entwickelt und verbessert, glaube ich, daß sie eine sehr nützliche Bereicherung der Wissenschaft sein wird.

Noch eine zweite Idee möchte ich kurz vor Ihnen diskutieren. Diese Idee beschäftigt sich mit dem Verständnis der Wirkungsweise einiger bereits vorhandener Arzneimittel. Am besten kann man dies an den Befunden mit Serotonin erörtern, obwohl man das gleiche auch mit anderen Metaboliten tun könnte. Die Idee besteht darin, daß einige schon vorhandene Arzneimittel natürlich vorkommende Antimetaboliten des Serotonin sind und daß sie einige ihrer pharmakologischen Eigenschaften dieser Tatsache verdanken.



Formel 9

In Formel 9 sehen Sie die Struktur des Serotonin und eines der *Harmala*-Alkaloide. Beachten Sie die Ähnlichkeit des Aufbaues. Die Seitenkette des Hormons ist umgebogen worden und mit dem Indolring verschmolzen und die phenolische Gruppe wurde um eine Stelle herunter

verschoben und methyliert. Bei einigen anderen *Harmala*-Alkaloiden ist dieser letzte Schritt nicht vorhanden, und die sind dann sogar dem Serotonin noch ähnlicher. Abb. 2 zeigt Ihnen, daß die Wirkungen von Serotonin auf glatte Muskeln durch Harmin antagonisiert werden können. Es handelt sich wieder um eine Kurve eines isolierten Rattenuterus und Sie können sehen, daß Harmin als ein Antagonist des Serotonin wirkt, genau so, wie es die synthetischen Antimetaboliten taten, die früher gezeigt wurden. Weil diese Substanz strukturell dem Hormon analog ist und weil sie die Wirkung des Hormons antagonisiert, könnte man sie als einen Antimetaboliten betrachten.

Es gibt noch eine andere Alkaloidklasse, die als eine nur etwas kompliziertere Gruppe von *Harmala*-Alkaloiden aufgefaßt werden kann. Es ist das die Klasse, zu der Yohimbin und Reserpin gehören. Die Struktur von Yohimbin ist der Formel 9 zu entnehmen, die auch die Verwandtschaft dieses Stoffes mit dem Serotonin illustriert. Wenn ich nun von einigen *Harmala*-Alkaloiden auf Yohimbin übergehe, ist die Hauptveränderung die Hinzufügung zweier weiterer Ringe. Man kann zeigen, daß Yohimbin als ein sehr guter Antagonist das Serotonin wirkt, wenn es an isolierten Organen ausgetestet wird. Tab. 3 zeigt Ihnen dies bei einer

Tabelle 3. *Antagonismus zwischen Serotonin und Yohimbin an Segmenten von Schafcarotiden*

Serotonin γ/cm^3	Yohimbin-Hydrochlorid γ/cm^3	Kontraktur der Hauptachse %
0	0	0
0,2	0	20
0,2	0,06	28
0,2	0,2	6
0,2	1,0	4
0	4,0	0
2,0	0	26
2,0	0,2	26

Verwendung von Arterienringen nach der oben beschriebenen Methode. Der Antagonismus zwischen Serotonin und Yohimbin ist sowohl reversibel als kompetitiv. Er ist daher noch auffälliger als die lange bekannte Demonstration des Antagonismus zwischen Adrenalin und Yohimbin, weil bei diesem Versuch der Antagonismus nicht frei reversibel ist.

Auch in einer dritten Klasse von pflanzlichen Alkaloiden konnte gezeigt werden, daß sie Antimetaboliten des Serotonin enthält. Es handelt sich um die Mutterkorn-Alkaloide. Die Analogie in der Struktur ist wiederum der Formel 9 zu entnehmen. In dieser Alkaloidklasse ist die Seitenkette des Serotonin im Gegensatz zu den *Harmala*-Alkaloiden und zum Yohimbin nach der entgegengesetzten Seite abgebogen und

mit dem Benzolteil des Ringes vereinigt worden. Genau so wie im Fall von Yohimbin sind noch besondere Ringe hinzugekommen. Eine Anzahl dieser Mutterkorn-Alkaloide wurden als Antiserotonine mit Arterienringen ausgetestet. Gaddum hat auch 2 von ihnen an anderen Geweben untersucht. Bei der Überwindung von Serotonineffekten am Arterienringsystem ist sowohl Ergotamin wie Ergotoxin sehr wirksam, aber als besonders mächtiges Wirkungsglied dieser Gruppe hat sich Lysergsäure-diäthylamid erwiesen. Wie Sie aus der Abbildung sehen können, ist der Unterschied der Alkaloide vom chemischen Standpunkt aus in der Natur des Amids am Ende des Moleküls gegeben. Tab. 4 zeigt Ihnen einige Ergebnisse, die mit Lysergsäure-diäthylamid (LSD) an isolierten Arterienringen gewonnen wurden.

Tabelle 4. *Serotonin und Lysergsäure-diäthylamid (LSD)-Einfluß auf die Kontraktur von Arterienringen der Carotis*

Serotonin γ/cm³	LSD γ/cm³	Abnahme des Ringdurchmessers %
0	0	0
0,2	0	31
0,2	0,03	23
0,2	0,1	15
0,2	0,3	12
0,2	1,0	6
0	10,0	—3

Lysergsäure-diäthylamid und einige andere Antiserotonine, die ich Ihnen heute gezeigt habe, sind auch noch in einem anderen Sinne interessant. Sie erzeugen Halluzinationen und andere Störungen im Zentralnervensystem. Diese Antimetabolite sind kürzlich in verschiedenen Laboratorien dazu verwendet worden, um eine Funktion des Serotonin am Nervensystem erkennen zu können, aber die Zeit erlaubt es mir nicht, diese sehr interessanten Resultate zu diskutieren. Es mag genügen, mitzuteilen, daß wir imstande gewesen sind, bei Mäusen eine charakteristische Art von abnormem Verhalten mit Lysergsäure-diäthylamid auszulösen. Mäuse, die damit behandelt werden, verhalten sich so wie normale Tiere, die befürchten, über eine schräge Fläche abzugleiten. Es ist freilich verlockend, anzunehmen, daß Lysergsäure-diäthylamid eine Halluzination des Bergabgleitens erzeugt, aber in dieser Angelegenheit ist natürlich Vorsicht am Platze. Immerhin wird aber dieses abnorme Verhalten bei vielen Mäusen durch die Injektion von Serotonin und auch eines cholinergischen Stoffes in das Gehirn verhindert. Periphere Anwendung ist erfolglos.

Um nun zur Hauptrichtung des Gedankens zurückzukehren, glaube ich, daß es Beweise dafür gibt, die es rechtfertigen, anzunehmen, daß

auch bereits existierende Arzneimittel, wie die *Harmala*-Alkaloide, Yohimbin und die Mutterkorn-Alkaloide einige ihrer pharmakologischen Wirkungen der Tatsache verdanken, daß sie Antimetaboliten des Serotonin sind. Das bedeutet, daß sie Strukturanaloge des Serotonin sind und mit ihm in Wettstreit um einen spezifischen Receptor am lebenden Gewebe treten. Wenn Serotonin der Schlüssel für dieses spezielle Schloß ist, dann haben derartige Pharmaka eine Form, die in das Schlüsselloch hineinpaßt und dadurch den Eintritt des Serotonin verhindern. Dies soll nicht sagen, daß das die vollständige Erklärung der Wirkung solcher Arzneimittel ist. Arbeiten aus der Vergangenheit zeigen klar, daß Adrenalin, wenn nicht noch andere Substanzen, an der Wirkung dieser Arzneimittel beteiligt sind. Trotzdem ist es klar, daß ein Teil der pharmakologischen Wirkungen spezifisch mit dem Serotonin verknüpft ist.

Ich hoffe, daß die Resultate der heute skizzierten Studien die Nützlichkeit der Konzeption von Antimetaboliten für das Verständnis der Arzneimittelwirkung illustrieren und ihren Wert bei der Voraussage neuer und vielleicht nützlicher Stoffe erkennen lassen. Dieser Vortrag mußte notwendigerweise kurz und oberflächlich sein. Manche von Ihnen werden vielleicht gegen einige Punkte des Vorgebrachten Einwände zu machen haben. Aber lassen Sie mich mit folgenden Worten schließen: mir sind die Schwierigkeiten durchaus gegenwärtig, aber ich habe bisher keine Ursache gefunden, die hier geschilderten Grundideen zu verlassen. Ich habe vielmehr das Gefühl, daß der Fortschritt der Pharmakologie teilweise in dieser Richtung gelegen ist.

J. Kühnau (Hamburg): Arzneimittelwirkungen und intermediärer Stoffwechsel

In einer Zeit, da die Klagen über zunehmende Spezialisierung in Naturwissenschaften und Medizin nicht verstummen wollen, muß es als erfreuliches Zeichen der Besinnung auf die Einheitlichkeit der Grundlagen aller naturwissenschaftlichen Erkenntnis gewertet werden, daß die einzelnen naturbeschreibenden Disziplinen sich in immer stärkerem Maße bemühen, durch Übernahme von Gedankengängen und Methoden aus Nachbarfächern ihre eigenen Erkenntnismöglichkeiten zu verbreitern und unter Betonung gemeinsamer Grundvorstellungen über die Grenzen des eigenen Faches hinaus vorzustoßen. So wie Anatomie und Biochemie, die noch vor wenigen Jahrzehnten keine Berührungspunkte besaßen und durch Verschiedenheit der Denkweise und Terminologie für immer voneinander getrennt schienen, heute eine gemeinsame Basis gefunden und aus dieser heraus neue Forschungsrichtungen wie die Histochemie entwickelt haben, so ist auch die moderne Pharmakologie zu der Einsicht

gelangt, daß sie ihrem erweiterten Aufgabenbereich nur unter Einbeziehung der Ergebnisse der neueren Stoffwechselforschung, also in Anlehnung an die Biochemie, gerecht zu werden vermag, die ihrerseits zweifellos einen Teil ihrer großen Erfolge in den letzten Jahren dem Kontakt mit Pharmakologie und Chemotherapie verdankt. Besonders deutlich ist der Wert dieses Erkenntnisaustausches im Falle der modernen Arzneimittelforschung. Erst die Einschaltung der Untersuchungsmethoden und Einsichten der biologischen Chemie hat es möglich gemacht, die meist empirisch erzielten Erfolge der Anwendung chemotherapeutisch und antibiotisch wirksamer Mittel ihrem Wesen nach zu deuten oder sie wenigstens durch eine tragfähige Theorie zu unterbauen.

Dabei hat sich ganz allgemein ergeben, daß fast alle chemotherapeutischen Effekte sich letzten Endes auf eine qualitative Beeinflussung des Zellproteinbestandes zurückführen lassen, sei es, daß es sich um eine unmittelbare chemische Reaktion zwischen Eiweiß und Pharmakon handelt, wie beim Stickstofflost oder bei den phosphorhaltigen Cholinesterasehemmstoffen, sei es, daß der weitaus häufigere Fall einer indirekten Einwirkung auf Enzymproteine über deren Coenzyme oder Substrate gegeben ist. In diesem zweiten Fall äußert sich die durch das Pharmakon bewirkte Abwandlung der Enzymaktivität in einer mehr oder weniger spezifischen Änderung bestimmter Abläufe des Intermediärstoffwechsels, aus deren Natur der Biochemiker auf den Wirkungsmechanismus des Arzneimittels schließen kann, und die meist auf einen biologischen Antagonismus oder eine Verdrängungsreaktion zwischen dem Pharmakon und einem Partner der durch das Pharmakon modifizierten enzymatischen Reaktion zurückgeführt werden kann. Damit tritt die von Woolley in dem vorangehenden Referat bereits gekennzeichnete Wirkstoff-Hemmstoff-Beziehung als beherrschendes Prinzip in den Vordergrund der stoffwechselchemischen Betrachtungsweise pharmakologischer Effekte. Die Allgemeingültigkeit dieses im Dienste der Einstellung biologischer Gleichgewichte stehenden und hierfür unentbehrlichen Prinzips wird dadurch beleuchtet, daß es im weitesten Umfang vom Organismus selbst zur Steuerung von Stoffwechselprozessen und ihrer Einregulierung auf ein optimales Mittelmaß verwendet wird.

So wird der Umsatz der Brenztraubensäure, der durch das Enzym Pyruvatoxydase katalysiert wird, gehemmt durch die strukturverwandte Oxybrenztraubensäure, die als physiologisches Umwandlungsprodukt des Serins ein zellvertrautes Zwischenglied in der Reaktionskette der Gluconeogenie darstellt, und dadurch, daß sie mit der Brenztraubensäure um das gleiche Enzym konkurriert, regulierend auf den Kohlenhydratstoffwechsel einwirkt[23]. Analog wird die von der Hexokinase katalysierte Phosphorylierung der Glucose in Gehirnextrakten[21] und die ebenfalls hexokinase-abhängige Glucoseaufnahme ins Rattenzwerchfell unter dem Einfluß von Insulin[33] durch den ubiquitär verbreiteten, der Glucose strukturanalogen Zellbestandteil Glucosamin kompetitiv gehemmt; Glucosamin steuert also die

Glucoseverwertung im Organismus. Von besonders großer Bedeutung ist die Tatsache, daß strukturanaloge Aminosäurepaare wie Leucin-Isoleucin, Valin-Isoleucin, Serin-Threonin und andere sich in Bakterien und Pilzen ebenso wie beim Säugetier gegenseitig in ihrem Umsatz antagonistisch beeinflussen und dadurch zur Aufrechterhaltung der normalen Mengenrelation der Aminosäuren im Organeiweiß[28] beitragen. Die schädlichen Wirkungen eines Überschusses an jeder Aminosäure, die einem solchen Antagonistenpaar angehört, kann durch eine die normale Mengenrelation wiederherstellende Mehrzufuhr des zugeordneten natürlichen Strukturanalogons beseitigt werden, wie dies bei der Ratte für die Aminosäurepaare Phenylalanin-Tryptophan[20] und Leucin-Isoleucin[4] gezeigt werden konnte. Offenbar stellen diese Antagonismen zwischen normalen Bausteinen der lebenden Substanz sehr zweckmäßige Vorrichtungen zur homöostatischen Selbststeuerung des Zucker- und Eiweißstoffwechsels dar und stehen, soweit es sich um gegensätzliche Beziehungen zwischen Aminosäuren handelt, im Dienste einer lebensnotwendigen Integration des Aminosäurehaushalts zum Zweck optimaler Eiweißsynthese.

Einer solchen Integration dient in besonders ausgesprochener Weise der bisher nur bei Bakterien genauer untersuchte Vorgang der „preferential synthesis", in dessen Verlauf aus einer gemeinsamen Vorstufe in stets gleichbleibender Reihenfolge und mit abnehmender Vordringlichkeit mehrere (bis zu sechs) Reaktionsprodukte nacheinander entstehen können[11]. Das bevorzugt gebildete Produkt dient als „Regulator der Biosynthese" aller Folgeprodukte, indem es nach Erreichung einer gewissen Mindestkonzentration als Hemmstoff der zu seiner eigenen Bildung notwendigen Reaktion wirkt und so den Umsatz seiner Vorstufe in Richtung der nächstbegünstigten Reaktion ablenkt, bei der sich dieser Vorgang wiederholen und zur Bildung eines dritten Reaktionsproduktes führen kann.

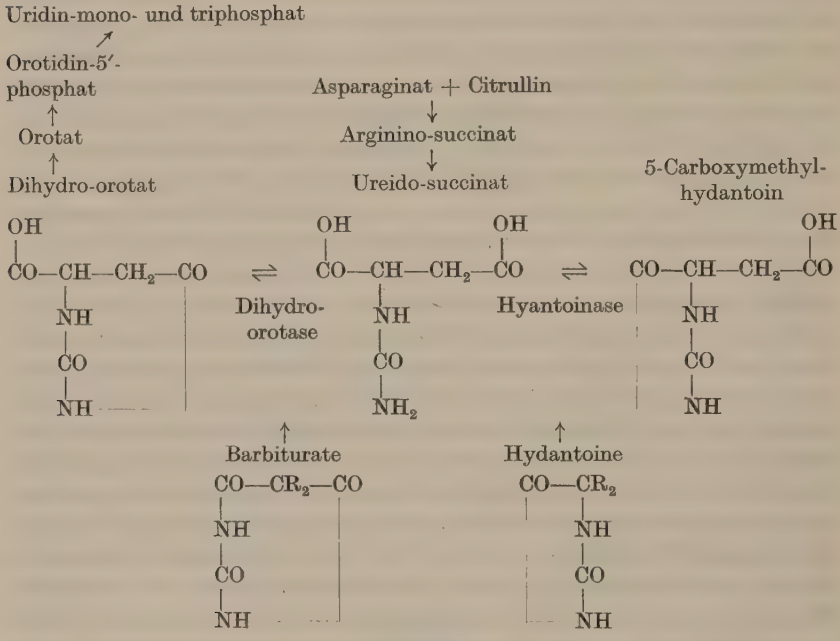
Erweist sich so die Metaboliten-Antimetaboliten-Beziehung als ein der Einstellung biologischer Gleichgewichte dienendes Fundamentalprinzip, so wird diese Bedeutung noch unterstrichen durch die Feststellung, daß Antimetaboliten als Produkte des Intermediärstoffwechsels nicht nur in demselben Organismus das Ausmaß enzymatischer Reaktionen begrenzen, sondern bei Bakterien, Pilzen und höheren Pflanzen auch als Sekretprodukte die Vitalität anderer um den gleichen Lebensraum konkurrierender Lebewesen hemmen und so außerhalb des eigenen Organismus Schutz- und Abwehrfunktionen erfüllen, die letzten Endes der Erhaltung eines biologischen Gleichgewichts in der Natur dienen. Derartige „Antibiotica" wirken in dem abzuwehrenden Lebewesen als Inhibitoren vitaler enzymatischer Reaktionen, indem sie Substrate oder Coenzyme von der Enzymoberfläche abdrängen oder sogar (im Fall von Aminosäureantagonisten) die Synthese von Enzymproteinen selbst blockieren. Für die meisten Antibiotica, deren chemische Konstitution bekannt ist, konnte der Nachweis einer maßgeblichen Beteiligung von Antimetaboliten am Aufbau des antibiotisch wirksamen Moleküls erbracht werden. So ist der wirksame Anteil des Moleküls von Streptomycin und Neomycin A ein Antagonist des Wirkstoffs Inosit, und ein wesentlicher Anteil der Wirkungen dieser Antibiotica ist durch eine Ausschaltung der biologischen Effekte des Inosits erklärbar[34]. Die aus Streptomycesarten isolierte, gegen Mycobakterien wirksame Actithiazinsäure ist ein Biotin-

Antagonist[16]. In anderen Antibioticis findet man eiweißfremde Aminosäuren als Molekülbestandteile, die den Einbau der ihnen strukturanalogen natürlichen Aminosäuren in Organproteine zu verhindern geeignet sind und so dem Antibioticum den Charakter eines Hemmstoffs der Eiweißsynthese verleihen. So enthält Gramicidin J die „unnatürlichen" Aminosäuren d-Ornithin, d-Leucin und d-Phenylalanin[41], im Molekül der Actinomycine findet sich d-Valin neben Sarcosin, N-Methylvalin und Alloisoleucin, in dem der Antibiotica Streptothricin, Viomycin und Roseothricin der Lysin-Antagonist β-Lysin[6], in den Antibioticis Nisin, Subtilin und Cinnamycin sind die Cystinantagonisten Lanthionin und Methyllanthionin als Molekülbausteine enthalten[2]; und Chloromycetin wirkt im Stoffwechsel der von ihm beeinflußten Mikroorganismen als Gegenspieler des l-Phenylalanins[45].

Die Tatsache, daß ein Organismus (etwa eine Streptomyces-Art) einen Antimetaboliten produziert, der für ihn selbst harmlos ist, andere Organismen (etwa Bakterien) dagegen durch Ausschaltung enzymatischer Reaktionen tiefgreifend schädigt, liefert den Beweis für das pharmakologisch sehr bedeutsame Prinzip, daß eine für eine bestimmte Art oder Gattung nachgewiesene antagonistische Beziehung zwischen zwei Stoffen keineswegs für die gesamte belebte Natur gültig sein muß, sondern in vielen Fällen nur in einem mehr oder minder eng begrenzten Kreis von Lebewesen, oft nur in wenigen Spezies einer Gattung nachweisbar ist. Derselbe Stoff, welcher im Stoffwechsel einer Bakterien- oder Pilzart als Antimetabolit oder Inhibitor einer biologischen Fundamentalreaktion wirkt, kann sich innerhalb anderer Organismen der gleichen Reaktion gegenüber indifferent verhalten, ja sogar als ihr Substrat auftreten und sie so begünstigen — ein Befund, der nur so zu erklären ist, daß die Voraussetzung für den Verdrängungseffekt eines Antimetaboliten ein spezifisch strukturiertes, zur Bindung von Substrat und Inhibitor (Antimetabolit) in gleicher Weise geeignetes Oberflächenareal des Fermentproteins ist, und daß in verschiedenen Organismen das Oberflächenrelief des die gleiche Reaktion katalysierenden Ferments gewisse Unterschiede aufweist, welche zwar die Bindung des physiologischen Substrats nicht beeinflussen, aber groß genug sind, um die Bindung strukturanaloger Pseudosubstrate und damit auch deren Antagonistenqualität im einen Fall zu ermöglichen, im anderen zu verhindern. *Dieser Nachweis der Existenz biologischer Antagonismen, die auf bestimmte Gruppen von Lebewesen beschränkt sind, war von größter Bedeutung für die Entwicklung der modernen Arzneimittellehre.* Im Falle der Antibiotica, die für den produzierenden Organismus harmlos sind, wird dieses Phänomen „begrenzter" oder „gezielter" Antagonismen von der Natur selbst zur Erhaltung biologischer Gleichgewichte benutzt: im Fall der Sulfonamide, die als Antagonisten eines Wirkstoffs (der p-Aminobenzoesäure)

nur für Bakterien, aber nicht für den Menschen Hemmstoffcharakter besitzen, hat das gleiche Phänomen erstmalig seinen hohen therapeutischen Wert bewiesen. Nachdem die hier der empirischen Beobachtung des Heileffekts nachfolgende Aufklärung des Wirkungsmodus (Woods, Fildes) den heuristischen Wert dieses Prinzips erwiesen hatte, gab die Möglichkeit der Herauszüchtung „gezielter" Antagonismen im Laboratorium dem Arzt immer neue Heilmittel an die Hand; so im Falle des Vitamins Pantothensäure, unter deren synthetischen Strukturanalogen einige nur gegenüber Bakterien, andere nur bei Trichomonaden, wieder andere nur gegenüber Malariaplasmodien Anti-Pantothensäure-Eigenschaften besitzen und damit das für den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel gleich wichtige Coenzym A ausschalten[29]. Hier ist auch das Atebrin zu nennen, dessen Anti-Lactoflavin-Effekt nur gegenüber Malariaplasmodien zur Geltung kommt[17]. Dabei ist nicht erforderlich, daß die Antagonistenqualität in dem verabfolgten Pharmakon vorgebildet ist, sondern sie entsteht oft erst im Organismus (als Prozeß der „Giftung") durch enzymatische Veränderung des Pharmakons; so entfaltet die Fluoressigsäure ihre Antimetabolitenwirkung im Säugetierkörper erst nach Umwandlung zu Fluorcitronensäure, einem Antagonisten der als Zwischenprodukt des Kohlenhydratstoffwechsels fungierenden Citronensäure. Besonders wichtig ist diese Erkenntnis für die Beurteilung der Wirkungsweise der Purin- und Pyrimidin-Antagonisten, die als Hemmstoffe der Nucleotid- und Nucleinsäuresynthese die Prozesse des malignen Wachstums sowohl von der Wirkstoff-(Coenzym-)Seite wie von der Baustoffseite her günstig beeinflussen und in der modernen Therapie des Carcinoms und der Hämoblastosen eine zunehmende Rolle spielen. Ihre biologische Leistung ist offenbar abhängig von ihrem Einbau in die Nucleosid- oder Nucleotidbindung, und erst das derart durch entsprechende Enzyme im Organismus gebildete Derivat des Purin- oder Pyrimidin-Analogons ist das eigentliche wirksame Arzneimittel. So erklärt sich etwa, daß sich die Wirkung des Purinantagonisten Coffein auf Enzymsysteme (z. B. Phosphorylase) nicht durch eine freie Purinbase, sondern nur durch das Nucleotid Adenylsäure aufheben oder verhindern läßt[26], und daß Purin- wie Pyrimidin-Antagonisten (Azaguanin, Bromuracil) durch die unspezifische Wirkung des Ferments Nucleosid-Phosphorylase im Gewebe ebenso wie die physiologisch vorkommenden Purine und Pyrimidine zu Nucleosiden aufgebaut werden, wodurch die zum Aufbau dieser abnormen Nucleoside benötigten Ribose- und Desoxyribosemoleküle ihrer eigentlichen Aufgabe im Rahmen der Nucleotid- und Nucleinsäuresynthese entzogen werden[25]; die darin zum Ausdruck kommende Funktion der Purinantagonisten, als „Ribosefalle" (ribose trap, Kalckar) zu wirken, ist ein wesentliches Fundament ihrer pharmakologischen Leistung. — Auch für die den Pyrimidinbasen struktur-

analogen Barbiturate ist möglicherweise ein ähnlicher Wirkungsmechanismus anzunehmen. Man weiß, daß die Barbiturate durch die Blockierung eines noch nicht sicher identifizierten Gliedes der Atmungskette die oxydative Phosphorylierung herabsetzen[24], und manches spricht dafür, daß auch die sedative und hypnotische Wirkung der

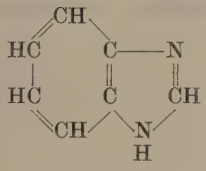


Formelbild 1

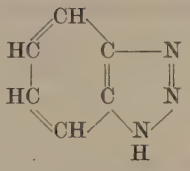
Barbiturate auf einer Verdrängungsreaktion gegenüber Pyrimidinnucleotiden beruht, die beim Prozeß der oxydativen Phosphorylierung eine Rolle spielen[7]. Die aus Asparaginsäure und Citrullin über Argininobernsteinsäure im Organismus gebildete Ureido-bernsteinsäure kann durch das Enzym Dihydro-orotase in Dihydro-orotsäure umgewandelt werden, welche die Vorstufe der Pyrimidinnucleotide, speziell der energiereichen Uridinpolyphosphate darstellt und der Barbitursäure chemisch sehr nahe steht (siehe Formelbild 1). Es liegt nahe anzunehmen, daß die Barbiturate entweder unmittelbar das Enzym Dihydro-orotase als Antagonisten seines Substrats, oder aber als Nucleoside die im Gehirn besonders aktive und für dessen Stoffwechsel besonders wichtige Nucleosidphosphorylase[38] im Sinne der oben erwähnten „Ribosefalle" hemmen und so die oxydative Phosphorylierung durch Blockierung der Synthese energiereicher Pyrimidinnucleotide entkoppeln. Für die Wirkung der Hydantoine käme ein verwandter Angriffsmodus in Frage, da die

Ureido-bernsteinsäure noch einem zweiten Abbaumodus zu Hydantoinessigsäure unterliegt, welche als Strukturanalogon der Antiepileptica vom Hydantointyp möglicherweise von diesen antagonistisch beeinflußt wird.

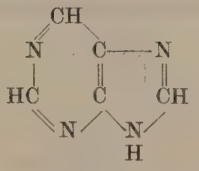
Eine erhebliche Erweiterung des Anwendungsbereiches der Arzneimittel mit Hemmstoffcharakter bedeutete die Synthese von Substanzen, die in ihrem Molekül Strukturanalogien zu mehreren Metaboliten vereinen und daher multiple Antagonismen entfalten. So ist Methioninsulfoximin, das neurotoxische Produkt der Mehlbleichung mit NCl_3, ein Doppelantagonist gegenüber Methionin und Glutamin und verdrängt beide



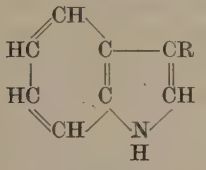
Benzimidazol



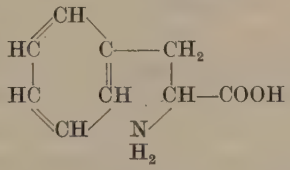
Benzotriazol



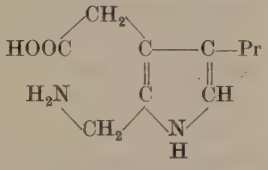
Purin



Tryptophan
(R = $CH_2CH(NH_2)COOH$)



Phenylalanin

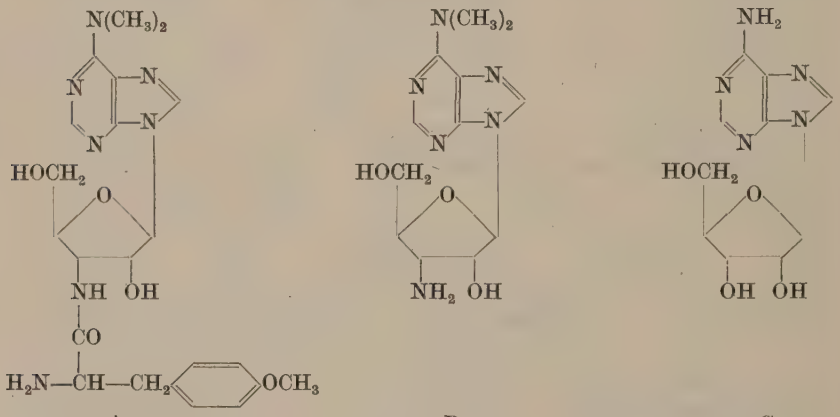


Porphobilinogen
(Pr = CH_2CH_2COOH)

Formelbild 2

Verbindungen aus der zentralnervösen Substanz[36]; analog blockiert 1,2-Dichlor-4,5-diaminobenzol die Wirkung der Vitamine Lactoflavin und B_{12}, die beide einen 1,2-Dimethyl-4,5-diaminobenzolrest enthalten[47]. Ein therapeutisch besonders wertvolles Beispiel eines multivalenten Antagonistentyps stellt die Gruppe der substituierten Benzimidazole und Benzotriazole dar, die gleichzeitig Antagonisten der Purinbasen, der cyclischen Aminosäuren, des eine Benzimidazolgruppierung enthaltenden Vitamins B_{12} und des Porphobilinogens (oder einer ihm nahestehenden Vorstufe des Häms) darstellen (siehe Formelbild 2). Als Purinantagonisten[46] hemmen sie die Synthese von Nucleotiden und Nucleinsäuren, als Aminosäure-Antimetaboliten die Eiweiß- und Enzymsynthese[40]; das Zusammentreffen beider Effekte bedingt die ausgeprägte Inhibitorwirkung dieser Stoffe gegenüber der Reduplikation von Viren (Vaccinia-, Influenza-, Psittacose- und Poliomyelitis-Virus)[42], dem Wachstum von Bakterien (E. coli, Str. lactis)[44], von pathogenen Pilzen (Trichophyton- und Microsporon-Arten)[37] und von Protozoen[14]. Als Antivitamine B_{12} blockieren 2,5- und 5,6-Dimethyl-benzimidazol das

Wachstum B_{12}-bedürftiger Bakterien, Grünalgen und Säugetiere[12], als Antagonisten des Porphobilinogens verhindern Benzimidazolderivate die Porphyrinsynthese und den Einbau von Glykokoll in Häm[1]. Auch das 6-Mercaptopurin ist ein Doppelantagonist, welcher sowohl Purinbasen[22] wie Coenzym A[5] aus dem Stoffwechsel verdrängt und, indem er auf diese Weise die Lieferung von Zellbaumaterial und gleichzeitig die Energieproduktion blockiert, in sehr wirksamer Weise die pathologisch gesteigerte Nucleoproteidsynthese bei Tumorerkrankungen oder Leukämien drosselt. Es ist zu erwarten, daß derartige polytrope Inhibitoren in der Chemotherapie der Zukunft eine große Rolle spielen werden, um so



A Puromycin B Puromycin-Nucleosid C Adenosin

Formelbild 3

mehr als auch die Natur von der Vielseitigkeit ihrer Wirkungsmöglichkeiten Gebrauch macht. So ist das von der Pilzart Streptomyces albuniger produzierte Antibioticum Puromycin ein nucleotidartig gebauter Antimetabolit, in dessen Molekül ein Purin-, ein Ribose- und ein Aminosäure-Antagonist miteinander verknüpft sind (siehe Formelbild[3]). Auf diese Weise wird die Nucleoproteidsynthese in den dagegen empfindlichen Organismen an drei Stellen (durch Verdrängung der Purinbase, Blockierung der Nucleosid- oder Nucleotidbindung und Behinderung des Aufbaus der Peptidketten) gleichzeitig gehemmt. Bemerkenswert ist, daß durch Abspaltung des Aminosäureantagonisten-Anteils aus dem Molekül des Puromycins dessen antibiotisches Wirkungsspektrum völlig verändert wird; der sehr breite bakteriostatische Effekt des Puromycins verschwindet und wird ersetzt durch eine trypanozide und carcinostatische Aktivität, die dem intakten Puromycin fehlt[3].

Neben dem Gesetz des Wirkstoff-Hemmstoff-Antagonismus, das sowohl als Prinzip physiologischer Steuerungen wie pharmakologischer

Effekte den Intermediärstoffwechsel beeinflußt, ist noch ein weiterer biologischer Mechanismus von allgemeiner Bedeutung für die Analyse der unter dem Einfluß von Arzneimittelwirkungen eintretenden Stoffwechselveränderungen. Seine Bedeutung kann in vollem Umfang nur erkannt werden, wenn man davon ausgeht, daß jede Einverleibung von Arzneimitteln, selbst im Falle körpereigener Substanzen, einen chemischen Reiz darstellt, der den Gesamtorganismus zu Umstellungs- und Anpassungsreaktionen zwingt. In vielen Fällen (Cortison, Isoniazid, Thyreostatica) werden die Reizbeantwortungen in endokrinen Gegenregulationen bestehen, die den Zwischenstoffwechsel in komplizierter Weise je nach der im Vordergrund stehenden Hormonaktivität beeinflussen. Neben diesen mittelbaren, vom Pharmakon selbst unabhängigen und in der Zahl ihrer Erscheinungsformen begrenzten Effekten sind jedoch die vielseitigen direkten und spezifischen Antworten der den Intermediärstoffwechsel steuernden Garnitur enzymatisch wirksamer Proteine von besonderem Interesse. Das Wesen dieser Reaktionen kann darin bestehen, daß diejenigen Pharmaka, die Strukturanalogien zu körpereigenen Substanzen aufweisen, gleich diesen durch präformierte Enzyme (Aminoxydase, Glucuronidase) chemisch verändert oder abgebaut werden, wobei einmal durch Verdrängung und damit Stabilisierung des physiologischen Substrats (Adrenalin!) oder aber den Bedarf der Enzyme an Cofaktoren und die Koppelung ihrer Wirkung an andere enzymatische (z. B. energieliefernde) Reaktionen wesentliche Rückwirkungen auf den Intermediärstoffwechsel ausgelöst werden können. Ein Beispiel für den zweiten Fall ist das durch bemerkenswerten Mangel an Spezifität ausgezeichnete Enzymsystem der Lebermikrosomen, welches so verschiedenartige Veränderungen am Arzneimittelmolekül wie Seitenketten- und Ringoxydation, Entalkylierung, Desaminierung und Ätherspaltung (Tab. 1) durchzuführen vermag, und für alle diese

Tabelle 1.

Ein in der Mikrosomenfraktion lokalisiertes, TPNH und freien Sauerstoff benötigendes, durch SKF 525-A hemmbares Enzymsystem der Leber bewirkt folgende Abbaureaktionen an Arzneimitteln:

1. Hydroxylierung aromatischer Verbindungen:
   Acetanilid, Sulfonamide, Chinolinderivate
2. Oxydation der Seitenkette von Barbituraten:
   Dial, Pernocton, Nembutal
3. Entalkylierung (oxydativ) von Alkylaminen:
   Pyramidon, Äthyl- und Butyl-pyramidon, Atebrin, Dolantin, Pervitin, Dibenamin (Abspaltung der β-Chloräthylgruppe!), Ephedrin
4. Ätherspaltung:
   Codein
5. Oxydative Desaminierung:
   Benzedrin, nach Entmethylierung auch Ephedrin und Pervitin.

Effekte auf die Anwesenheit von O_2 und TPNH angewiesen ist[30]. Die Unentbehrlichkeit von TPNH in diesem System setzt wiederum voraus, daß dieser Stoff in ausreichender Menge durch TPN-abhängige Oxydationsvorgänge, vor allem durch direkte Oxydation der Glucose nach Dickens-Horecker, bereitgestellt wird. Einverleibung von Medikamenten, die Substrate dieses Enzymsystems sind, setzt also eine Reihe von Stoffwechselprozessen in Gang, die mit der Arzneimittelwirkung unmittelbar nichts zu tun haben. Es kommt hinzu, daß die Arzneimittelumsetzenden Enzyme, die zum großen Teil kein physiologisches Substrat haben, vielfach nicht präformiert in der Zelle vorliegen, sondern erst auf den Reiz der Arzneimittelzufuhr hin als Produkte einer spezifisch orientierten Proteinsynthese gebildet werden[32]. Derartige „adaptative" oder besser „induzierte" Enzymsynthesen sind in großer Zahl bei Mikroorganismen bekannt geworden und in der Mikrobiologie eingehend untersucht worden, spielen aber auch beim Säuger eine große, noch zu wenig beachtete Rolle (Beispiele: Lactasebildung im Darm nach protahierter Milchzuckerzufuhr, Vermehrung der Alkoholdehydrase der Rattenleber nach chronischer Alkoholapplikation). Die Produktion solcher induzierter, gewissermaßen erst bei Bedarf entstehender Enzyme kann einmal durch eine spezifisch vom Substrat ausgelöste de-novo-Synthese von Enzymprotein, aber auch durch Umprägung bis dahin funktionsloser („stummer") Reserveproteine der Zelle erfolgen[9]. Solche Vorgänge spielen schon unter physiologischen Bedingungen eine viel größere Rolle, als im allgemeinen angenommen wird. So zeigt das Phänomen des Hungerdiabetes, daß die Enzymgarnitur des Kohlenhydratstoffwechsels nur bei ausreichendem Kohlenhydratangebot in normalem Ausmaß synthetisiert wird[43], und ähnliche Beobachtungen liegen für die Enzyme des Fettstoffwechsels[8] und des Eiweißumsatzes (Tryptophan-Peroxydase[27]) vor. Dabei kann das prägende Agens von einfachster chemischer Beschaffenheit sein. Für die Hefezelle ist der Beweis erbracht, daß hier schon der Luftsauerstoff die Bildung Sauerstoff-verwertender Enzyme, vor allem des Warburgschen Atmungsferments induzieren kann[39]. Das gleiche Prinzip unterliegt der Wirkung vieler Arzneimittel. Auch hier genügt einfachste chemische Konstitution, um spezifische synthetische Prozesse erheblichen Ausmaßes auszulösen; so vermag dreiwertiges Eisen (etwa als Ferriammoniumcitrat) schon bei Einverleibung in kleinsten Mengen im Säugetierorganismus eine umfangreiche spezifische Eiweißsynthese zu induzieren, indem es die Bildung des zur Eisenbindung befähigten Proteins Apoferritin aus Aminosäuren anregt und dadurch seine eigene Fixierung und Speicherung als Eisen-Protein-Komplex (Ferritin) in die Wege leitet[13]. Man wird diesen durch Isotopenversuche gesicherten Vorgang als Modell eines ganz generellen pharmakologischen Stoffwechseleffektes ansehen und daraus folgern dürfen, daß alle Pharmaka, die im

Körper irgendeine Bindung mit Eiweiß eingehen, mit der Fähigkeit der Induktion einer Synthese spezifischer Proteine begabt sind. Der Arzt hat es auf diese Weise in der Hand, die Eiweißsynthese als Grundlage aller Regenerations- und Heilungsprozesse durch Darreichung von Pharmaka, die spezifisch mit Proteinen reagieren, nicht nur generell anzuregen, sondern darüber hinaus in bestimmte Bahnen zu lenken und ihren Schwerpunkt gezielt in bestimmte Organe oder Zellsysteme zu verlegen. Aber so wertvolle therapeutische Konsequenzen sich auf der einen Seite aus dieser Induktionswirkung von Arzneimitteln ergeben, so unerwünschte Folgen kann der gleiche Effekt haben, wenn durch ihn Mechanismen geschaffen werden, die die Inaktivierung eines Pharmakons durch chemischen Abbau oder die Erzeugung einer Arzneimittelresistenz zur Folge haben. Auch diese Phänomene sind Sonderfälle einer adaptativen oder induzierten Enzymproduktion; sie können durch induzierte Synthese von Enzymproteinen hervorgerufen werden, die entweder das Arzneimittel zerstören oder den von ihm ursprünglich beeinflußten Stoffwechselprozeß auf einem neuen, vom Pharmakon unabhängigen Wege ablaufen lassen. Beispielhaft für die erste Möglichkeit ist die Synthese einer Penicillinase durch Penicillin in B. cereus; diese induzierte Enzymsynthese erfolgt genau proportional dem Umfang der Fixierung des Penicillins in der Bakteriensubstanz[35]. Der zweite Fall liegt dem Verhalten des Streptomycins gegenüber E. coli zugrunde; die primär vorhandene Streptomycin-Empfindlichkeit kann durch Um- und Neuprägungsvorgänge am katalytisch wirksamen Bakterieneiweiß über eine Indifferenz gegenüber Streptomycin sogar in eine Abhängigkeit von diesem Antibioticum übergehen[15]; hier wird also der ursprüngliche Hemmstoff zum Wirkstoff. Eine analoge Wirkungsumkehr ist auch für das Aminopterin im Fall der Mäuseleukämiezellen[31] und für Sulfanilamid im Fall einer Neurospora-Mutante[48] bekannt, und ihr Wert für die pharmakologische Grundlagenforschung wird dadurch nicht beeinträchtigt, daß in diesen der Mikrobiologie entnommenen Beispielen die Unterscheidung zwischen phänotypischer Induktion und mutativer Anpassung nicht leicht fällt.

Jedenfalls stellt das Phänomen der Arzneimittelresistenz und der ihr wesensgleichen induktiven Enzymsynthese die Konsequenz einer spezifisch orientierten Enzymsynthese dar, die da, wo sie unerwünscht ist, nach dem Prinzip des Wirkstoff-Hemmstoff-Gegensatzes durch Aminosäureantagonisten blockiert werden kann. So hemmen Tryptazan[19], p-Fluorphenylalanin[18] und andere Aminosäure-Antimetaboliten[10] die induktive Enzymsynthese bei Hefe und Bakterien in einem der gleichzeitig beobachteten Wachstumshemmung etwa proportionalen Umfang. Es ist zu erwarten, daß die Pharmakologie der Zukunft von dieser Möglichkeit der Zügelung einer unerwünschten Proteinsynthese als

Ursache einer Arzneimittelresistenz erfolgreichen Gebrauch machen wird.

Von den zahllosen Formen des Eingreifens von Arzneimitteln in Vorgänge des Intermediärstoffwechsels konnten in der voranstehenden Übersicht nur einige, die von besonders weitreichender und grundsätzlicher Bedeutung sind, einer genaueren Analyse unterzogen werden. Aber schon diese Auswahl zeigt, wie eng Pharmakologie und Biochemie miteinander verknüpft sind, und wie fruchtbringend und wertvoll sich die Hilfsstellung der biochemischen Forschung auf die Analyse der theoretischen Grundlagen und der praktisch-therapeutischen Auswirkungen der heutigen Arzneimittellehre auswirkt.

Literatur

[1] Abbott, L. D., and M. J. Dodson: J. of Biol. Chem. **211**, 845 (1954). — [2] Alderton, G.: J. Amer. Chem. Soc. **75**, 2391 (1953). — Newton, G. G. F., E. P. Abraham and N. F. Berridge: Nature (Lond.) **171**, 606 (1953). — [3] Baker, B. R., J. P. Joseph and J. H. Williams: J. Amer. Chem. Soc. **76**, 2838 (1954). — [4] Benton, D. A., A. E. Harper and C. A. Elvehjem: Arch. of Biochem. a. Biophysics **57**, 6 (1955). — [5] Biesele, J. J.: J. Biophys. Biochem. Cytol. **1**, 119 (1955). — [6] Binkley, S. B.: Annual Rev. Biochem. **24**, 597 (1955). — [7] Brody, T. M., and J. A. Bain: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, 148 (1954). — Bain, J. A.: Federat. Proc. **11**, 653 (1952). — [8] Cirillo, V. P.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **88**, 353 (1955). — [9] Cohn, M., et A. Torriani: C. r. Acad. Sci. (Paris) **232**, 15 (1951). — [10] Creaser, E. H.: J. Gen. Microbiol. **12**, 288 (1955). — [11] Davis, B. D.: Experientia (Basel) **6**, 41 (1950). — J. Bacter. **64**, 729 (1952). — [12] Emerson, G. A., N. G. Brink, F. W. Holly, F. Koniuszy, D. Heyl and K. Folkers: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 3084 (1950). — Hendlin, D., and M. H. Soars: J. Bacter. **62**, 633 (1951). — Oginsky, E. L., and P. H. Smith: J. Bacter. **65**, 183 (1953). — [13] Fineberg, R. A., and D. M. Greenberg: J. of Biol. Chem. **214**, 97, 107 (1955). — [14] Gillespie, H. B., M. Engelman and S. Graff: J. Amer. Chem. Soc. **76**, 3531 (1954). — [15] Goldstein, A.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 326 (1954). — [16] Grundy, W. E., A. L. Whitman, E. G. and E. J. Rdzok, M. E. Hanes and J. C. Sylvester: Antibiotics a. Chemother. **2**, 399 (1952). — Umezawa, H., K. Oikawa, Y. Okami and K. Maeda: J. Bacter. **66**, 118 (1953). — [17] Haas, E.: J. of Biol. Chem. **155**, 321 (1944). — Wright, C. I., and J. C. Sabine: J. of Biol. Chem. **155**, 315 (1944). — [18] Halvorson, H. O., and S. Spiegelman: J. Bacter. **64**, 207 (1952); **65**, 496, 601 (1953). — Chantrenne, H., and C. Courtois: Biochim. et Biophysica Acta **14**, 397 (1954). — [19] Halvorson, H., S. Spiegelman and R. L. Hinman: Arch. of Biochem. a. Biophysics **55**, 512 (1955). — [20] Hankes, L. V., L. M. Henderson, W. L. Brickson and C. A. Elvehjem: J. of Biol. Chem. **174**, 873 (1948). — [21] Harpur, R. P., and J. H. Quastel: Nature (Lond.) **164**, 693 (1949). — [22] Hitchings, G. H., and G. B. Elion: Ann. New York Acad. Sci. **60**, 195 (1954). — [23] Holzer, H., H. W. Goedde u. S. Schneider: Biochem. Z. **327**, 245 (1955). — [24] Jalling, O., O. Lindberg u. L. Ernster: Acta chem. scand. (Copenh.) **9**, 198 (1955). — Ernster, L., H. Löw u. O. Lindberg: Acta chem. scand. (Copenh.) **9**, 200 (1955). — [25] Kalckar, H. M.: Biochim. et Biophysica Acta **12**, 250 (1953). — [26] Kihlman, B., and K. Øvergaard-Hansen: Exper. Cell. Res. **8**, 252 (1955). — [27] Knox, W. E., and A. H. Mehler: J. of biol. Chem. **187**, 419 (1950). — Science (Lancaster, Pa.) **113**, 237 (1951). — [28] Kühnau, J.: Angew. Chem. **61**, 357 (1949). — [29] Kühnau, J.:

Verh. Dtsch. Kongr. Inn. Med. **58**, 30 (1952). — [30] La Du, B. N., L. Gaudette, N. Trousof and B. B. Brodie: J. of Biol. Chem. **214**, 741 (1955). — Axelrod, J.: J. of Biol. Chem. **214**, 753 (1955). — [31] Law, L. W., and P. J. Boyle: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **77**, 340 (1951). — [32] Monod, J., and M. Cohn: Adv. Enzymol. **13**, 67 (1952). — [33] Nakada, H. J., T. N. Morita and A. N. Wick: J. of Biol. Chem. **215**, 803 (1955). — [34] Overman, R. S., and I. S. Wright: J. of Biol. Chem. **174**, 759 (1948). — Söderhjelm, L., u. B. Zetterberg: Uppsala Läkaref. Förh. **53**, 235 (1948). — [35] Pollock, M. R., and C. J. Perret: Brit. J. Exper. Path. **32**, 387 (1951). — [36] Reiner, L., F. Misani and P. Weiss: Arch. of Biochem. a. Biophysics **25**, 447 (1950). — Pace, J., and E. E. McDermott: Nature (Lond.) **169**, 415 (1952). — [37] Rieth, H.: Diss. Hamburg 1954. — [38] Robins, E., D. E. Smith and R. E. McCaman: J. of Biol. Chem. **204**, 927 (1953). — [39] Slonimski, P. P.: Formation des enzymes respiratoires chez la levure. Paris: Masson 1953. — [40] Slonimski, P. P.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **238**, 1361 (1954). — [41] Synge, R. L.M.: Biochemic. J. **39**, 365 (1945); **44**, 542 (1949). — [42] Tamm, J., und Mitarbeiter (C. H. Shunk, D. Heyl, F. L. Horsfall, K. Folkers): J. of Exper. Med. **98**, 219, 229, 245 (1953); **99**, 227 (1954). — Thompson, R. L.: J. of Immun. **55**, 345 (1947). — Hannoun, C.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **235**, 1340 (1952). — Brown, G. C.: siehe [46]. — [43] Wollenberger, A., and M. A. Linton: Amer. J. Physiol. **148**, 597 (1947). — Drury, D. R., A. N. Wick and E. M. McKay: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **75**, 479 (1951). — Masoro, E. J., J. L. Chaikoff, S. S. Chernick and J. M. Felts: J. of Biol. Chem. **185**, 845 (1950). — [44] Woolley, D. W.: J. of Biol. Chem. **152**, 224 (1944). — [45] Woolley, D. W.: J. of Biol. Chem. **185**, 293 (1950). — [46] Woolley, D. W.: J. of Biol. Chem. **152**, 225 (1944). — Klotz, I. M., and M. Mellody: J. Bacter. **56**, 253 (1948). — Galston, A. W., R. S. Baker and J. W. King: Physiologia Plantarum **6**, 863 (1953). — Brown, G. C.: J. of Immun. **69**, 441 (1952). — [47] Wolley, D. W., and A. Pringle: J. of Biol. Chem. **194**, 729 (1952). — [48] Zalokar, M.: J. Bacter. **60**, 191 (1950).

Diskussion

Eichholtz (Heidelberg): Nach Untersuchungen von Fawaz am Herz-Lungen-Präparat des Hundes führt Fluoressigsäure zur Anhäufung von Citronensäure im Herzmuskel. Dieser Stop im Citronensäure-Cyclus kann durch relativ kleine Dosen von Propionsäure oder Propylalkohol aufgehoben werden. Ein kompetitiver Antagonismus zwischen Propyl- und Acetyl-Radikal wird debattiert.

Wolf (Genf): Vielleicht darf man zu diesem Thema auch die Opiat-Antagonisten vom Allyltyp erwähnen, d. h. die Beziehungen von N-Allyl bzw. (-)-3-Oxy-N-allyl-morphinan zu Morphin, (-)-3-Oxy-N-methyl-morphinan (Laevorphan) sowie anderen natürlichen und synthetischen Analgetica mit morphinähnlicher Wirkung. Ob hier nur Verdrängungserscheinungen vorliegen, erscheint nicht sicher, da bei strukturell abweichend gebauten synthetischen Analgetica die gleichen Phänomene beobachtet werden, wenn auch teilweise nur nach hohen Dosen der letzteren. Ungeklärt ist ebenso die Beobachtung, daß die genannten Opiat-Antagonisten zwar an sich eine Atemdepression erzeugen (also wie Morphin wirken). Ist jedoch vorher Morphin oder Laevorphan und ähnliches gegeben und von diesen eine Atemdepression hervorgerufen, so tritt die antagonistische, die Atemdepression mindernde bis aufhebende Wirkung dieser Allylverbindungen ein. Diese und weitere Eigenschaften der Allylverbindungen lassen es möglich erscheinen, die Therapie mit Analgetica in weniger gefährliche Bahnen lenken zu können.

H. Tuppy (Wien): Natürliche oxytocische Substanzen

Stoffe natürlichen Ursprungs mit der Eigenschaft, die Muskulatur des Uterus zu erregen und diesen zu Kontraktionen zu veranlassen, finden sich in mehreren chemischen Verbindungsklassen. Vor allem bei bestimmten verhältnismäßig einfach gebauten Aminen (wie Acetylcholin, Tyramin, Serotonin, Histamin; unter gewissen Umständen auch Noradrenalin, Adrenalin und Ephedrin), bei Adenosin-Verbindungen, bei einigen Alkaloiden komplizierterer Struktur (so bei Mutterkorn- und China-Alkaloiden) und schließlich bei einer Reihe von Polypeptiden tritt eine uterusstimulierende Aktivität kräftig in Erscheinung. Der vorliegende Bericht beschränkt sich auf die letztgenannte Gruppe: auf jene Oxytocica, die ihrer chemischen Natur nach *Polypeptide* sind.

Unter diesen stehen die zwei Hormone der Neurohypophyse, *Oxytocin* und *Vasopressin*, an hervorragender Stelle: Oxytocin fungiert als physiologischer Wehenerreger; es zeichnet sich vor vielen anderen oxytocischen Substanzen dadurch aus, daß es in sehr geringer Menge und verhältnismäßig spezifisch auf den Uterus wirkt; außerdem sind Oxytocin und Vasopressin die ersten Polypeptid-Hormone, deren chemische Strukturen sowohl aufgeklärt als auch seit kurzem — dank der bewunderungswürdigen Arbeiten von du Vigneaud und seinen Mitarbeitern — synthetisch zugänglich sind. Dies verleiht ihnen besondere Aktualität.

I. Oxytocin

Voraussetzung für die Ermittlung der Struktur und der pharmakologischen Eigenschaften des Oxytocins war die Gewinnung reiner, von inertem Material und vom Schwesterhormon Vasopressin freier Präparate. Schon im Jahre 1928 gelang es Kamm und seinen Mitarbeitern[21], Hypophysenhinterlappen-Extrakte durch fraktionierte Fällungen mit organischen Lösungsmitteln in mehrere Fraktionen zu spalten, von denen eine eine hohe oxytocische, eine andere eine hohe vasopressorische Aktivität besaß. Eine weitergehende Trennung und Reinigung erzielten in späteren Jahren vor allem Potts u. Gallagher[36], welche hochwirksame Präparate beider Hormone durch Chromatographie an einem Kationen-Austauscher gewannen; aus ihren Befunden ging bereits hervor, daß die beiden Hypophysenhinterlappen-Wirkstoffe einander chemisch sehr nahe verwandt sind. Aber erst du Vigneaud und seine Mitarbeiter[25, 31, 32] erreichten in den Jahren 1949/50 dadurch eine völlige Reinigung des Oxytocins, daß sie die von Kamm ausgearbeitete Trennungsmethode mit dem inzwischen von Craig entwickelten Verfahren der Gegenstromverteilung kombinierten. Das von ihnen gewonnene, reinste Oxytocin zeigte eine Aktivität von 500 I E/mg[33].

Oxytocin liefert bei der totalen Hydrolyse mit Säure je ein Mol der 8 Aminosäuren Leucin (Leu), Isoleucin (Ileu), Tyrosin (Tyr), Prolin (Pro), Glutaminsäure (Glu), Asparaginsäure (Asp), Glykokoll (Gly) und Cystin $(CyS)_2$, sowie 3 Mole Ammoniak[31]. Die Frage, wie diese Aminosäure- und Ammoniakreste im Peptidhormon miteinander verknüpft sind, wurde 1953 gleichzeitig von DU VIGNEAUDS Arbeitsgruppe an der Cornell University[54] und von uns in Wien[45, 46] beantwortet; die Strukturermittlung erfolgte unabhängig, sie führte auf verschiedenen Wegen zum gleichen Ziel.

Wir bedienten uns im wesentlichen derselben Methoden wie zuvor SANGER und seine Mitarbeiter bei der Aufklärung der Aminosäure-Sequenzen in den Peptidketten des Insulins[40, 41]. Das Hormonpeptid wurde zunächst mit Perameisensäure behandelt. Dieses Reagens oxydiert Cystin, $(CyS)_2$, auch wenn es in Peptidketten eingebaut ist, quantitativ zu zwei Molekülen Cysteinsäure (2 $CySO_3H$). Es sprengt im Oxytocin die Disulfidbrücke, welche die zwei Hälften des Cystinrestes und dadurch zwei Teile des Hormons zusammenhält. Wie sich durch papierchromatographische Untersuchung zeigen ließ, bestand das Oxydationsprodukt aus einer einzigen Substanz; es war keine Spaltung des Moleküls in Bruchstücke eingetreten.

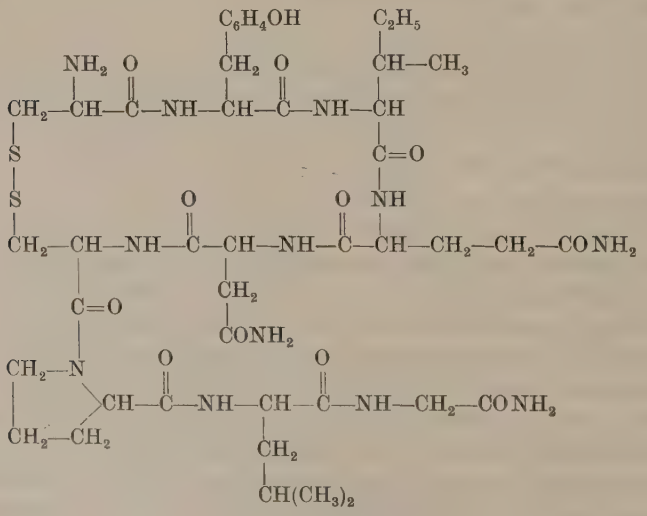
Oxytocin ist demnach nicht aus zwei durch die Disulfidgruppierung des Cystinrestes verbundenen Peptidketten zusammengesetzt, vielmehr verknüpfen die Schwefelatome zwei Teile einer einzigen Peptidkette unter Ausbildung eines Ringes. Das erste Glied (die „N-terminale" Aminosäure) in der geraden, durch die Oxydation geöffneten Peptidkette ist ein Cysteinsäurerest; dafür zeugt der mit SANGERS Reagens Fluordinitrobenzol[38] erhobene Befund, daß einer der beiden Cysteinsäurereste des oxydierten Oxytocins eine freie, unverknüpfte Aminogruppe trägt. Am anderen Ende (in der „C-terminalen" Stellung) der Peptidkette befindet sich Glykokoll in Form eines Glycinamidrestes; denn es ließ sich unter den Spaltprodukten, die bei der Einwirkung der bakteriellen Proteinase Subtilisin[17, 40] auf das oxydierte Oxytocin entstanden, Glycinamid papierchromatographisch nachweisen.

Zur Feststellung der Reihenfolge, in der die übrigen Aminosäuren zwischen den terminalen Resten $CySO_3H$ und Gly angeordnet sind, wurde das oxydierte Oxytocin sowohl schonender Hydrolyse mit Säure als auch proteolytischer Spaltung unterworfen. Hierbei entstanden eine größere Zahl von Abbaupeptiden, welche mit Hilfe papierchromatographischer und ionophoretischer Verfahren isoliert und charakterisiert werden konnten. Aus der Natur dieser Spaltprodukte ließ sich die Sequenz der Aminosäurereste im oxydierten Polypeptid und (durch Ersatz der 2 Cysteinsäure- durch 2 halbe Cystinreste) auch jene im Oxytocin selbst erschließen. In Tab. 1 sind die Resultate, die zur Formulierung der Struktur des Oxytocins (Formel 1) führten, in einer Übersicht zusammengestellt.

Tabelle 1. *Ermittlung der Struktur des Oxytocins*[45, 46]

Feststellung des N-terminalen Aminosäurerestes in oxydiertem Oxytocin mit Hilfe der Dinitrophenylierungs-Methode	$CySO_3H$
Aus oxydiertem Oxytocin durch Einwirkung von Subtilisin erhaltene Spaltprodukte	$CySO_3H$ — [Tyr, Ileu, Glu(NH_2)], Asp(NH_2) — [$CySO_3H$, Pro, Leu], Gly(NH_2)
Aus oxydiertem Oxytocin durch partielle Hydrolyse mit HCl erhaltene Peptide	$CySO_3H$ — Tyr, Ileu — Glu, Tyr — [Ileu, Glu], Asp — $CySO_3H$, Leu — Gly, $CySO_3H$ — [Pro, Leu]
Struktur des oxydierten Oxytocins	$CySO_3H$ — Tyr — Ileu — Glu(NH_2) — — Asp(NH_2) — $CySO_3H$ — Pro — Leu — Gly(NH_2)
Struktur des Oxytocins (siehe auch Formel 1)	CyS — Tyr — Ileu — Glu(NH_2) — Asp(NH_2) — CyS — Pro — Leu — Gly(NH_2)

Zur Aufstellung der gleichen Strukturformel führten die Versuche DU VIGNEAUDS und seiner Mitarbeiter. Den amerikanischen Forschern gelang auch der überzeugendste und abschließende Beweis für die Richtigkeit der mittels Abbau erschlossenen Struktur, indem sie diese



Formel 1. Oxytocin

in einer großartigen Synthese aufbauten und die Eigenschaften des natürlichen und des synthetischen Oxytocins miteinander verglichen[53].

Die Synthese wurde folgendermaßen bewerkstelligt: Es wurden geeignete substituierte Derivate eines Dipeptids, eines Tripeptids und eines Tetrapeptids hergestellt: L-[N-Carbobenzoxy-S-Benzyl]-CySH-L-Tyr, L-[N-Tosyl]-Ileu-L-Glu(NH_2)-L-Asp(NH_2) und L-[S-Benzyl]-CySH-L-Pro-L-Leu-Gly(NH_2). Das Tri- und das Tetrapeptid-Derivat ließen sich miteinander unter Verwendung von Andersons Pyrophosphit-Methode[2] kondensieren. Vom entstandenen Heptapeptid-Derivat L-[N-Tosyl]-Ileu-L-Glu (NH_2)-L-Asp (NH_2)-L-[S-Benzyl]-CySH-L-Pro-L-Leu-Gly (NH_2) wurde der Tosylrest abgespalten. Die dadurch freigesetzte terminale Aminogruppe war dann imstande, unter dem Einfluß von Pyrophosphit eine Peptidbindung mit der terminalen Carboxylgruppe des Dipeptidderivats einzugehen. Das gebildete L-[N-Carbobenzoxy-S-Benzyl]-CySH-L-Tyr-L-Ileu-L-Glu (NH_2)-L-Asp (NH_2)-L-[S-Benzyl]-CySH-L-Pro-L-Leu-Gly (NH_2) mußte nun noch von seinen Carbobenzoxy- und Benzylgruppen befreit und die zwei Cysteinreste (CySH) miteinander durch Oxydation mit Luftsauerstoff unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zu einem Cystinrest zusammengeschweißt werden. Das auf diese Weise — allerdings mit sehr geringer Ausbeute — dargestellte Produkt besaß die gleichen chemischen und physikalischen, aber auch die gleichen biologischen Eigenschaften wie Oxytocin natürlicher Herkunft.

Dank du Vigneauds Reindarstellung des Oxytocins sowohl aus natürlichen Quellen als auch durch Synthese war es möglich, die biologischen Wirkungen des Hormons einwandfrei festzustellen; nun erst war die Gefahr beseitigt, daß die eine oder andere Wirkung qualitativ oder quantitativ durch die Anwesenheit verunreinigender Stoffe verändert sein könnte.

Die Erregung der Uterusmuskulatur durch Oxytocin ist eine überaus empfindliche Reaktion. Am isolierten Rattenuterus lassen sich 0,005 E in einem Badvolumen von 10 ml noch ausgezeichnet nachweisen; Oxytocin mit 500 IE/mg ist demnach noch in einer Verdünnung von 10^{-9} (1/100 γ in 10 ml) kräftig wirksam.

Neben der uterusstimulierenden Fähigkeit des Oxytocins sind vor allem die vasodepressorische Wirkung bei Vögeln und die milcheinschießende Wirkung bei Säugetieren ausgeprägt. Zur Auslösung einer Milchejektion sind in vivo erstaunlich geringe Mengen Oxytocin erforderlich: Bereits 1 γ oder ½ IE Oxytocin bewirkt bei stillenden Frauen in 20—30 sec Milchejektion[27]. Es scheint gerechtfertigt, Oxytocin zu diesem Zweck klinisch-therapeutisch zu verwenden.

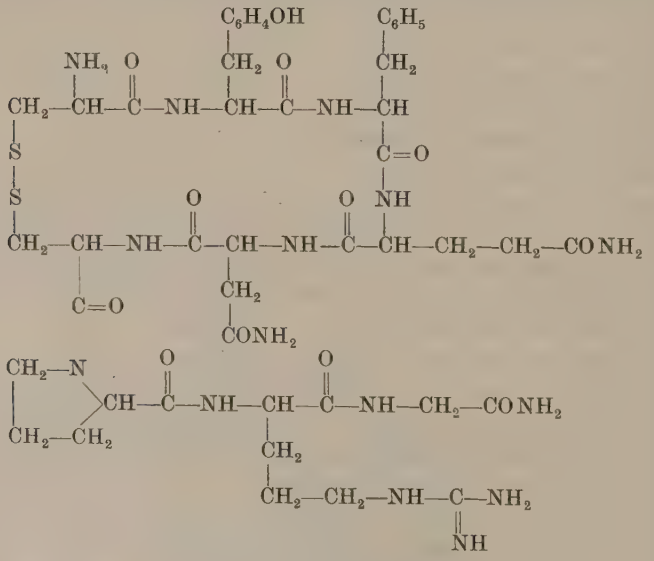
Vergleicht man die uteruserregende Kraft des Oxytocins mit der der einfacher gebauten oxytocisch wirksamen Amine, wie z. B. Acetylcholin, Serotonin, Histamin, so erweist sich das Polypeptid als bedeutend stärker. Stellt man in Rechnung, daß Oxytocin ein Molekulargewicht von 867, ein einfacheres Amin wie Histamin jedoch ein solches von nur 87 besitzt, so erhöht sich noch das Wirkungsverhältnis zugunsten des Oxytocins um einen Faktor von 10. Die im Polypeptid-Molekül vorhandene „pharmakodynamische Gruppierung" ist demnach außerordentlich wirksam.

Die Frage, warum gerade die dem Oxytocin eigene Polypeptidstruktur die glatte Muskulatur und insbesondere die Gebärmutter kräftig zu stimulieren vermag, läßt sich derzeit nicht beantworten. Ein Weg zu einem Verständnis des Zusammenhangs von Peptidstruktur und biologischer Wirksamkeit ist jedoch der einer Betrachtung, inwieweit kleine Änderungen der Struktur zu Änderungen auch der pharmakologischen bzw. physiologischen Eigenschaften führen.

II. Vasopressin

Es ist ein besonders interessanter und glücklicher Umstand, daß das zweite Hypophysenhinterlappen-Hormon, Vasopressin, ein dem Oxytocin strukturell sehr ähnliches Produkt ist und glänzende Vergleichsmöglichkeiten bietet. Die Aufklärung der Struktur des Vasopressins erfolgte gleichzeitig und unabhängig durch du Vigneaud und seine Mitarbeiter in den Vereinigten Staaten[52] und durch den Arbeitskreis um Fromageot[1] in Paris. Die bei der Aufklärung angewendeten Methoden waren jenen sehr ähnlich, die bei der Besprechung des Oxytocins dargelegt worden sind. Die beiden Forschergruppen kamen zum übereinstimmenden Ergebnis, daß im Vasopressin der gleiche Bauplan hinsichtlich Aminosäure-Sequenz und Ringstruktur verwirklicht ist wie in Oxytocin; nur der Isoleucinrest des Oxytocins ist durch Phenylalanin und der Leucinrest durch Arginin ersetzt (Formel 2).

Diese verhältnismäßig geringfügige Änderung der Struktur hat jedoch eine gewaltige Änderung der biologischen Eigenschaften zur Folge.



Formel 2. Vasopressin (Rind)

Vasopressin zeigt bekanntlich eine kräftige blutdrucksteigernde, eine darmkontrahierende und eine besonders mächtige antidiuretische Wirkung. Von DU VIGNEAUD aus Rinder-Hypophysen extrahiertes und durch Gegenstromverteilung gereinigtes Vasopressin[51] besitzt eine vasopressorische Aktivität von 500—600 IE/mg. Die antidiuretische Wirkung ist eines der stärksten überhaupt bekannten pharmakodynamischen Phänomene: Sie tritt bereits mit $^1/_{100000}\,\gamma$ Vasopressin je Kilogramm in Erscheinung.

Für den vorliegenden Bericht ist jedoch von besonderem Interesse, inwieweit Vasopressin uterusstimulierende Wirksamkeit zeigt, da es sich ja von Oxytocin in seiner Struktur nur durch die Natur zweier Aminosäurereste unterscheidet. Wirklich besitzen auch die allerreinsten, von Oxytocin völlig freien Vasopressin-Präparate eine uterusstimulierende Aktivität von 25—30 E/mg (bei Auswertung am isolierten Rattenuterus)[35]. Vasopressin ist also ein etwa 20mal schwächeres Ocytocicum als Oxytocin selbst, aber immer noch in einer 50millionenfachen Verdünnung (in einer Menge von $^1/_5\,\gamma$ in 10 ml) wirksam. In Anbetracht der überaus mächtigen Wirksamkeit des Oxytocins zählt Vasopressin trotz 20mal geringerer Aktivität zu den stärksten unter den heute bekannten Oxytocica.

Es ist erwähnenswert, daß die von Oxytocin hervorgerufenen Wirkungen der Blutdrucksenkung bei Vögeln und der Milchejektion beim Säugetier ebenfalls zu den biologischen Eigenschaften des Vasopressins gehören[7, 35]; seine Wirksamkeit beträgt etwa $^1/_7$ bzw. $^1/_6$ von der des Oxytocins.

Andererseits zeigt auch Oxytocin noch Eigenschaften, die für Vasopressin charakteristisch sind, allerdings in sehr geringem Maße: Die blutdrucksteigernde und die antidiuretische Aktivität des Oxytocins betragen nur 6 bzw. 3 E/mg[11, 35] (gegenüber 500—600 bei Vasopressin selbst).

III. Synthetische Variation der Struktur

Mit der Synthese des Oxytocins und Vasopressins durch DU VIGNEAUD war der Weg auch zur synthetischen Darstellung oxytocinähnlicher Polypeptide und zu einer Untersuchung ihrer Wirksamkeiten gebahnt. Wie DU VIGNEAUD auf dem III. Internationalen Kongreß für Biochemie in Brüssel bekanntgegeben hat, ist ein Polypeptid mit oxytocinähnlicher Struktur in seinem Institut dargestellt und pharmakologisch ausgetestet worden. Das synthetisierte Produkt steht seinem chemischen Aufbau nach zwischen Oxytocin und Vasopressin. Die (vorläufig als „Oxypressin" bezeichnete) Zwittersubstanz,

CyS—Tyr—*Phe*—Glu(NH_2)—Asp(NH_2)—CyS—Pro—*Leu*—Gly(NH_2),

besitzt das Phenylalanin des Vasopressins, jedoch das Leucin des Oxytocins. Obwohl sie sich von letzterem nur durch den Austausch eines

Isoleucinrestes durch einen Phenylalaninrest unterscheidet, hat sie doch nur $^1/_3$ der uterusstimulierenden und $^1/_{10}$ der blutdrucksenkenden Wirksamkeit des Oxytocins. Daraus ergibt sich, daß sogar eine unpolarer Aminosäurerest wie der des Isoleucins, welcher eine einfache aliphatische Seitenkette trägt, nicht ohne bedeutende Minderung der Aktivität durch einen anderen unpolaren Rest, Phenylalanin, welcher allerdings aromatischer Natur ist, ersetzt werden kann. Noch viel drastischer wirkt sich der Ersatz des Arginins durch Leucin für die vasopressorische Wirksamkeit aus. Diese beträgt nur 3 I E/mg und ist somit nicht größer als die des Oxytocins. Offensichtlich ist die basische Natur dieses Aminosäurerestes für die blutdrucksteigernde Wirkung von entscheidender Bedeutung.

IV. Natürliche Variation der Polypeptidstruktur

Ein anderer Weg, die Abhängigkeit der uterusstimulierenden Wirksamkeit von der Peptidstruktur zu untersuchen, wäre eine Isolierung von Oxytocin aus verschiedenen, nicht zu nahe verwandten Tierarten, gefolgt von einer Ermittlung der Struktur und der biologischen Wirksamkeit des Hormons verschiedener Herkunft. Wie wir heute wissen, erfährt die Sequenz der Aminosäuren in natürlich vorkommenden Polypeptiden und Proteinen oft eine Modifikation, wenn man von einer Tierart zur anderen übergeht. So wie der Chemiker auf synthetischem Wege kleine Abwandlungen in der Struktur pharmakologisch interessanter Substanzen herbeizuführen vermag, so scheint bei natürlich vorkommenden Wirkstoffen von polypeptidartigen Aufbau die Biosynthese bei verschiedenen Organismen kleine Variationen der Struktur zu bewirken. Es ist bekannt, daß Insulin verschiedener Herkunft sich strukturell in chemischen Details unterscheidet; diese „Artspezifität" des Insulins geht aus Untersuchungen, wie sie von Sanger[39], Lens[24] und Harfenist[18] angestellt worden sind, hervor. Das Vorliegen einer Artspezifität der Aminosäure-Sequenz ist in letzter Zeit in Wien auch an Cytochrom c festgestellt und strukturell aufgeklärt worden[47, 48]. In Untersuchungen, die wir wiederum du Vigneaud und seinen Mitarbeitern verdanken, hat sich auch an Vasopressin eine Artspezifität der Struktur sicherstellen lassen[34]. Während das aus Rinder-Hypophysen isolierte Hormon die zuvor angegebene Struktur besitzt, ist in Vasopressin aus Schweine-Hypophysen der Argininrest durch einen Lysinrest ersetzt. Es ist anzunehmen, daß eine ähnliche Artspezifität bei Oxytocin besteht. Oxytocinpräparate aus Rinder- und aus Schweine-Hypophysenhinterlappen haben sich allerdings (im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Vasopressin) als miteinander völlig identisch erwiesen[33]. Man kann jedoch hoffen, daß bei Oxytocin Variationen der Struktur auffindbar sein werden, sobald sich die Untersuchung auf andere Tierarten erstrecken wird.

V. Aktive Polypeptide in Serum-Proteolysaten

Wenn auch heute der chemische Aufbau des Oxytocins und des Vasopressins bekannt ist und mit den Eigenschaften dieser zwei Polypeptide die uteruskontrahierende, blutdrucksteigernde und antidiuretische Wirkung von Hypophysenhinterlappen-Extrakten hinreichend erklärt zu sein scheint, so bleibt doch bemerkenswert, daß VAN DYKE im Jahr 1942 die Isolierung eines anscheinend homogenen Proteins aus Rinder-Hypophysen beschrieb[12], welches alle 3 genannten Wirkungen in sich vereinigte. Dieser Befund fand viel Widerspruch; er läßt sich jedoch mit der Tatsache der Existenz der zwei voneinander unabhängigen und niedermolekularen Polypeptid-Hormone in Einklang bringen, wenn man postuliert, daß die Peptide in der Hypophyse oder bereits im Hypothalamus durch eine proteolytische Spaltung aus einem einzigen höhermolekularen Protein entstehen. Für diese Annahme konnten bisher keine direkten experimentellen Argumente beigebracht werden. Wohl aber kann man einen indirekten Hinweis in CROXATTOS interessanter Entdeckung sehen, daß aus Serum durch Inkubation mit Pepsin Polypeptide mit oxytocischer[9], vasopressorischer[8] und antidiuretischer Wirkung[10] entstehen. Die überraschende Analogie zwischen den Hypophysenhinterlappen-Hormonen und diesen als *Pepsitocin*, *Pepsitensin* und *Pepsanurin* bezeichneten Substanzen macht ihre chemische und pharmakologische Bearbeitung zu einer besonders reizvollen Aufgabe.

Pepsitocin, das uteruserregende Polypeptid des Serumproteolysats, welches uns hier vor allem interessieren muß, wurde kürzlich von TURBA u. HETZEL[50] in Mainz in hochgereinigter Form gewonnen. Die angewendeten Isolierungsoperationen waren Fraktionierung mit organischen Lösungsmitteln, Verteilungschromatographie und Hochspannungs-Elektrophorese. Das so gewonnene Polypeptid verhielt sich bei einer Anzahl von Reinheitsprüfungen wie eine einheitliche Substanz. Seine oxytocische Aktivität betrug allerdings nur $2\frac{1}{2}$ E/mg und war somit 200mal geringer als die des hypophysären Oxytocins. Bei der Endgruppen-Bestimmung wurde Asparagin als einziger amino-endständiger Aminosäurerest gefunden (gegenüber Halbcystin bei Oxytocin). Eine qualitative Bestimmung der das Pepsitocin aufbauenden Aminosäuren zeigte, daß Cystin, Prolin und Tyrosin, welche in Oxytocin vorkommen, dem Pepsitocin fehlen, dieses andererseits die drei basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin enthält, welche in Oxytocin nicht vorhanden sind. Eine nahe chemische Verwandtschaft oder etwa gar eine Identität des Pepsitocins mit Oxytocin ist somit ausgeschlossen. Darum wäre es jedoch nicht minder lohnend, die Aminosäurefolge in Pepsitocin, welche für die uteruserregende Wirkung verantwortlich ist, kennenzulernen. Die geringen Ausbeuten, welche TURBA u. HETZEL bei der Darstellung des Polypeptids aus Serum erreichten, machten eine nähere

chemische Charakterisierung unmöglich; es wären 5000—10000 l Serum erforderlich gewesen. Wir haben uns darum in letzter Zeit in Wien mit einer rationelleren Darstellungsweise des Pepsitocins befaßt und bis jetzt eine 60fache Steigerung der Ausbeute erreicht, so daß die Voraussetzung für eine nähere chemische Untersuchung geschaffen zu sein scheint.

Ähnlich wie aus Serum durch Einwirkung von Pepsin Stoffe entstehen, die den Uterus erregen sowie Blutdruck und Diurese beeinflussen, treten auch bei Verdauung mit anderen proteolytischen Fermenten Substanzen von Polypeptidnatur auf, die auf die glatte Muskulatur einwirken und in mehr oder minder ausgeprägter Weise oxytocische Aktivität besitzen. So setzen Trypsin oder Schlangengift aus Serum *Bradykinin* frei (Rocha e Silva, Beraldo u. Rosenfeld[37]). Kallikrein (Frey u. Kraut[15]), ein Ferment, welches aus Pankreas und Speicheldrüsen, jedoch auch aus Urin erhältlich ist, führt zum Auftreten von *Kallidin* (Werle u. a.[56, 58]). Ein Enzym in Hundeurin läßt, wie Beraldo gefunden hat[4], eine *Substanz U* auftreten. Schließlich setzt Renin das kräftig blutdrucksteigernde *Hypertensin* (*Angiotonin*) in Freiheit (Muñoz u. a.[26]; Page u. Helmer[28]). Wenn auch bei den letztgenannten Polypeptiden die uteruskontrahierende Wirksamkeit gegenüber der Wirkung auf Darmmuskulatur und Blutgefäße stark in den Hintergrund tritt, sind sie doch auch bei einer Besprechung natürlicher Oxytocica infolge interessanter Analogien zu Oxytocin und Pepsitocin nicht fehl am Platz.

Überraschenderweise entstehen mindestens sechs auf die glatte Muskulatur wirkende Polypeptide (Pepsitocin, Pepsitensin und Pepsanurin, sowie Kallidin, Bradykinin und Hypertensin) aus der gleichen Eiweißfraktion des Blutserums; diese wird gewöhnlich als „Hypertensinogen"-Fraktion bezeichnet und ist elektrophoretisch als α_2-Globulin-Fraktion charakterisiert. Es ist allerdings bis jetzt nicht endgültig entschieden[3], ob alle diese Peptide aus einem und demselben Protein der α_2-Globulin-Fraktion hervorgehen oder aus verschiedenen, wenn auch sehr ähnlichen Eiweißkörpern.

So wie die Proteinvorläufer dieser Polypeptide eine zumindest große Ähnlichkeit untereinander zeigen, so auch die aktiven Polypeptide selbst. Wenngleich die Kenntnisse heute noch sehr bruchstückhaft sind, können doch bereits einige allgemeine Feststellungen gemacht werden: Die auf die glatte Muskulatur erregend wirkenden Polypeptide sind kochbeständig, auch noch in schwach saurer Lösung; sie werden hingegen durch Alkali und durch starke Säuren erwartungsgemäß leicht zerstört. Sie besitzen eine im Vergleich zu anderen Polypeptiden hohe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wie Eisessig, Phenol und in Alkoholen. Sie sind basischer Natur, wandern also im elektrischen Feld bei neutralem p_H zur Kathode. Es ist wert festgehalten zu werden, daß die genannten Peptide Kochbeständigkeit, Löslichkeitseigenschaften und basischen

Charakter mit den zuvor besprochenen Hormon-Polypeptiden der Neurohypophyse, Oxytocin und Vasopressin, teilen.

Angesichts der Ähnlichkeit sowohl der Vorläufer als auch der Art der Entstehung unter dem Einfluß proteolytischer Fermente als auch der wirksamen Substanzen selbst ist es verlockend anzunehmen, daß die Polypeptide (oder wenigstens einige von ihnen) aus dem gleichen Protein durch Proteolyse herausgebrochen worden sind. Es wäre denkbar, daß sie verschiedene Abschnitte einer und derselben Proteinkette darstellen. Vielleicht haben sie einen Teil der Aminosäure-Sequenz gemeinsam, jenen Teil, der für die Erregung der glatten Muskulatur verantwortlich ist, während der ungleiche Rest der Polypeptid-Moleküle die Organspezifität der Wirkung beeinflußt.

Solche Überlegungen müssen hypothetischer Natur bleiben, solange nicht mehr über die chemische Struktur der Peptide bekannt ist. Leider sind jedoch — abgesehen von Pepsitocin — erst Bradykinin und Hypertensin chemisch näher untersucht worden. Für Hypertensin wurden aus vier verschiedenen Laboratorien Bausteinanalysen veröffentlicht, welche jedoch nicht völlig übereinstimmen[6, 23, 29, 43]. Eine Feststellung der Aminosäure-Sequenz ist bisher in keinem Fall durchgeführt worden.

Die zuletzt besprochenen, auf die glatte Muskulatur wirkenden Polypeptide verdanken ihre Entstehung einem proteolytischen Abbau normaler Serumproteine. Es ist die Frage, ob ein solcher Abbau unter natürlichen Bedingungen im Organismus abläuft. Diese Frage kann für die Entstehung des Hypertensins unter der Einwirkung von Renin mit großer Bestimmtheit bejaht werden. Im Falle der übrigen Polypeptide ist die Situation ungeklärt. Die Tatsache jedoch, daß sich in Plasma und anderen Körperflüssigkeiten proteolytische Enzyme finden, die wohl gewöhnlich in maskierter, inaktiver, bisweilen aber auch in aktiver Form auftreten, läßt es als möglich erscheinen, daß die Entstehung der Polypeptide ein natürlich ablaufender Vorgang ist. Beraldo[5] konnte jedenfalls zeigen, daß Bradykinin nicht nur durch Schlangengift und durch Trypsin, sondern auch durch das proteolytische Ferment des Serums, Plasmin (Fibrinolysin), in Freiheit gesetzt werden kann.

VI. Andere oxytocisch wirkende Polypeptide

Im Gegensatz zu den Polypeptiden, welche zu ihrer Bildung eiweißspaltender Fermente bedürfen, scheinen andere, welche ebenfalls die glatte Muskulatur stimulieren, in verschiedenen Organen und Körperflüssigkeiten in freier Form vorzukommen. So entdeckten von Euler u. Gaddum[13] in Extrakten sowohl aus Darm als auch aus Gehirn das als „*Substanz P*" bezeichnete Polypeptid, welches vielfach bearbeitet und in den letzten Jahren besonders gründlich von Pernow untersucht worden ist[30]. Aus Zwölffingerdarm-Schleimhaut konnten Ivy u. Oldberg[20] das

Cholecystokinin extrahieren, welches jedoch erst sehr unvollkommen charakterisiert ist. Während Substanz P eine besonders kräftige Wirkung auf die Darmmuskulatur ausübt, kontrahiert Cholecystokinin vor allem die Gallenblase; beide sind, wenngleich in schwächerem Maße, auch oxytocisch wirksam. Besonderes Interesse verdient eine kürzlich von Fried u. Wüst in München aus Ovarien extrahierte Substanz[16], ein Polypeptid, welches den Uterus, nicht jedoch den Darm zu Kontraktionen anzuregen scheint. Werle u. Erdös, ebenfalls in München, isolierten zu gleicher Zeit aus menschlichem Urin eine *Substanz Z*[57], welche sowohl Uterus als auch Darm stimuliert und wahrscheinlich ebenfalls ein Polypeptid ist. Der von Vogt gefundene „Darmstoff"[55], den man früher für ein Polypeptid hielt, ist jedoch später als eine organische Säure erkannt worden.

VII. Zur Frage des Receptors für die Polypeptide in der glatten Muskulatur

So groß die Zahl der natürlich vorkommenden Substanzen mit uteruserregender Wirksamkeit ist, so gering ist unsere Kenntnis ihrer Natur — abgesehen von der Tatsache, daß die meisten Polypeptide sind. Nicht größer ist unsere Kenntnis des Receptors bzw. der Receptoren für diese Polypeptide. Warum zeigen die glatten Muskeln verschiedener Organe und verschiedener Organismen so gewaltige Unterschiede in ihrer Ansprechbarkeit auf verschiedene Polypeptide? Warum zeigt ein und dasselbe Organ unter verschiedenen physiologischen Bedingungen eine stark veränderte Ansprechbarkeit? Zahlreich sind die offenen Fragen solcher Art.

Von Bedeutung könnte in diesem Zusammenhang der neuerdings mehreren Orts erhobene Befund sein, daß es natürliche Substanzen gibt, welche die Aktivität des Uterus herabsetzen und dadurch der erregenden Funktion des Oxytocins entgegenwirken. Diese wurden bald als „*uterine relaxing factor*"[22, 14], bald als „*pregnancy protecting factor*"[44] bezeichnet, bald zu dem von Hisaw[19] gefundenen *Relaxin* in Beziehung gebracht[42]. Die wirksame Substanz oder wirksamen Substanzen scheinen während der Schwangerschaft in beträchtlicher Menge aufzutreten und Tonus und Motilität des Uterus zu vermindern. Nach ihrem Verschwinden einige Stunden vor der Geburt setzen die Wehen ein.

O. Stamm[44] unternahm Versuche zur Reinigung eines solchen gegenüber Oxytocin antagonistisch wirkenden Faktors und kam zum überraschenden Ergebnis, daß dieser ebenso wie Oxytocin selbst ein Körper von relativ niedrigem Molekulargewicht ist, Polypeptidnatur besitzt und in Dosen der Größenordnung von Mikrogrammen wirksam ist. Wenn dem so ist, dann gibt es nicht nur natürliche Oxytocica, sondern auch natürliche Antioxytocica von Polypeptidnatur.

Nimmt man an, daß zwischen oxytocischen Polypeptiden und ihren Receptoren in der glatten Muskulatur eine ähnliche Spezifität und Art der

Wechselwirkung besteht, wie zwischen Metaboliten und den ihnen zugeordneten Enzymen, dann ist die Vorstellung nicht abwegig, daß es auch Hemmstoffe geben kann, welche die Receptoren blockieren, so wie es die Antimetabolite im Falle der Enzyme tun (vgl. WOOLLEY[59]). Die Suche nach Polypeptiden, welche kompetitiv Oxytocin und andere Polypeptid-Oxytocica hemmen, ist eine theoretisch und praktisch gleichermaßen interessante Aufgabe für die Zukunft.

Literatur

[1] ACHER, R., and J. CHAUVET: Biochim. et Biophysica Acta **12**, 487 (1953); **14**, 421 (1954). — [2] ANDERSON, G. W., J. BLODINGER and A. D. WELCHER: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 5309 (1952). — [3] ARMAN, C. G. VAN: In J. H. GADDUM: Polypeptides which stimulate plain muscle, S. 103. Edinburgh u. London: E. & S. Livingstone Ltd. 1955. — [4] BERALDO, W. T.: Amer. J. Physiol. **171**, 371 (1952). — [5] BERALDO, W. T.: Amer. J. Physiol. **163**, 283 (1950). — [6] BUMPUS, F. M., and I. H. PAGE: Science (Lancaster, Pa.) **119**, 849 (1954). — [7] CROSS, B. A., and H. B. VAN DYKE: J. of Endocrin. **9**, 232 (1953). — [8] CROXATTO, H., and R. CROXATTO: Science (Lancaster, Pa.) **95**, 101 (1942). —[9] CROXATTO, H., G. ROJAS and L. BARNAFI: Science (Lancaster, Pa.) **113**, 494 (1951). — [10] CROXATTO, H., G. ROJAS and L. BARNAFI: Acta physiol. lat. amer. **1**, 178 (1951). — [11] DYKE, H. B. VAN: J. of Endocrin. **9**, IV (1953). — [12] DYKE, H. B. VAN, B. F. CHOW, R. O. GREEP and A. ROTHEN: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **74**, 190 (1942). — [13] EULER, U. S. VON and J. H. GADDUM: J. of Physiol. **72**, 74 (1931). — [14] FELTON, L. C., E. H. FRIEDEN and H. H. BRYANT: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 160 (1953). — [15] FREY, E. K., u. H. KRAUT: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **133**, 1 (1928). — [16] FRIED, R., u. L. WÜST: Naturwissenschaften **41**, 553 (1954). — [17] GÜNTELBERG, A. V., and M. OTTESEN: Nature (Lond.) **170**, 802 (1952). — [18] HARFENIST, E. J.: J. Amer. Chem. Soc. **75**, 5528 (1953). — [19] HISAW, F. L.: Physiologic. Zool. **2**, 59 (1929). — [20] IVY, A. C., and E. OLDBERG: Amer. J. Physiol. **86**, 599 (1928). — [21] KAMM, O., T. B. ALDRICH, I. W. GROTE, L. W. ROWE and E. P. BUGBEE: J. Amer. Chem. Soc. **50**, 573 (1928). — [22] KRANTZ, J. C., H. H. BRYANT and C. CARR: Surg. etc. **90**, 372 (1950). — [23] KUETHER, C. A., and M. E. HANEY: Science (Lancaster, Pa.) **121**, 65 (1955). — [24] LENS, J., and A. EVERTZEN: Biochim. et Biophysica Acta **8**, 332 (1952). — [25] LIVERMORE, A. H., and V. DU VIGNEAUD: J. of Biol. Chem. **180**, 365 (1949). — [26] MUÑOZ, J. M., E. BRAUN-MENÉNDEZ, J. C. FASCIOLO and L. F. LELOIR: Nature (Lond.) **144**, 980 (1939). — [27] NICKERSON, K., R. W. BONSNES, R. G. DOUGLAS, P. CONDLIFFE and V. DU VIGNEAUD: Amer. J. Obstetr. **67**, 1028 (1954). — [28] PAGE, I. H., and O. M. HELMER: J. of Exper. Med. **71**, 29 (1940). — [29] PEART, W. S.: Biochemic. J. **60**, VI (1955). — [30] PERNOW, B.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, Suppl. 105 (1953). — [31] PIERCE, J. G., and V. DU VIGNEAUD: J. of Biol. Chem. **182**, 359 (1950). — [32] PIERCE, J. G., and V. DU VIGNEAUD: J. of Biol. Chem. **186**, 77 (1950). — [33] PIERCE, J. G., S. GORDON and V. DU VIGNEAUD: J. of Biol. Chem. **199**, 929 (1952). — [34] POPENOE, E. A., H. C. LAWLER and V. DU VIGNEAUD: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 3713 (1952). — [35] POPENOE, E. A., J. G. PIERCE, V. DU VIGNEAUD and H. B. VAN DYKE: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **81**, 506 (1952). — [36] POTTS, A. M., and T. F. GALLAGHER: J. of Biol. Chem. **143**, 561 (1942); **154**, 349 (1944). — [37] ROCHA E SILVA, M., W. T. BERALDO and G. ROSENFELD: Amer. J. Physiol. **156**, 261 (1949). — [38] SANGER, F.: Biochemic. J. **39**, 507 (1945). — [39] SANGER, F.: Nature (Lond.) **164**, 529 (1949). — [40] SANGER, F., and E. O. P. THOMPSON: Biochemic. J. **53**, 353, 366 (1953). — [41] SANGER, F., and H. TUPPY: Biochemic. J. **49**, 463, 481 (1951). — [42] SAWYER, W. H., E. H. FRIEDEN and A. C. MARTIN: Amer. J.

Physiol. **172**, 547 (1953). — [43] Skeggs, L. T., W. H. Marsh, J. R. Kahn and N. P. Shumway: J. of Exper. Med. **100**, 363 (1954). — [44] Stamm, O.: Intern. Kongr. f. Gynäkol. u. Geburtsh., Genf 1954. — [45] Tuppy, H.: Biochim. et Biophysica Acta **11**, 449 (1953). — [46] Tuppy, H., u. H. Michl: Mh. Chem. (Wien) **84**, 1011 (1953). — [47] Tuppy, H., u. G. Bodo: Mh. Chem. (Wien) **85**, 1082 (1954). — [48] Tuppy, H., u. S. Paléus: Acta chem. scand. (Copenh.) **9**, 353 (1955). — [49] Tuppy, H.: Mh. Chem. (Wien) **84**, 996 (1953). — [50] Turba, F., u. H. Hetzel: Biochem. Z. **325**, 524 (1954). — [51] Turner, R. A., J. G. Pierce and V. du Vigneaud: J. of Biol. Chem. **191**, 21 (1951). — [52] du Vigneaud, V., H. C. Lawler and E. A. Popenoe: J. Amer. Chem. Soc. **75**, 4880 (1953). — [53] du Vigneaud, V., C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts and P. G. Katsoyannis: J. Amer. Chem. Soc. **76**, 3115 (1954). — [54] du Vigneaud, V., C. Ressler and S. Trippett: J. of Biol. Chem. **205**, 949 (1953). — [55] Vogt, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 1 (1949). — [56] Werle, E., u. U. Berek: Biochem. Z. **320**, 136 (1950). — [57] Werle, E., u. E. G. Erdös: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 234 (1954). — [58] Werle, E., W. Götze u. A. Keppler: Biochem. Z. **289**, 217 (1937). — [59] Woolley, D. W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 68 (1956).

D. K. de Jongh (Amsterdam): Synthetische oxytocische Substanzen

Die modernen Lehrbücher der Pharmakologie und Pharmakotherapie kennzeichnen sich u. a. dadurch, daß neben den von alters her bekannten Naturheilmitteln in vielen Fällen eine Reihe von Synthetica besprochen wird. Neben Morphin stehen die synthetischen Analgetica, neben Codein die synthetischen Hustmittel, neben Curare die synthetischen curarisierenden Stoffe, neben Adrenalin synthetische Sympathicomimetica usw. In vielen Fällen ist die Frage, was besser sei, das Naturheilmittel oder ein Syntheticum ungeklärt, mitunter ist sie unzweideutig zugunsten des Syntheticums entschieden worden. Wenn man in denselben Büchern das Kapitel Oxytocica aufschlägt, dann werden dort die Secale-Alkaloide und das Hypophyse-Hinterlappenhormon Oxytocin ausführlich besprochen und es wird mit nur wenig Worten erwähnt, daß außer dem Ergobasin sich einige nahe verwandte Halbsynthetica wie Methyl-Ergobasin als sehr brauchbar erwiesen haben. Synthetica im engeren Sinn aber, werden meistens nicht genannt.

Es zeigt sich also, daß nach der gangbaren Auffassung keine Produkte der Chemie bekanntgeworden sind, die es verdienen, synthetische Oxytocica genannt zu werden. Formal gesprochen würde ich dem ehrenvollen Auftrag, den die Deutsche Pharmakologische Gesellschaft so freundlich war mir zu erteilen, daher nachkommen, wenn ich erwähnte, daß synthetische Oxytocica überhaupt nicht bestehen, so daß ich von den 45 min Sprechzeit, die mir gestattet sind, nur einige nötig hätte. Ich nehme jedoch an, daß dies nicht in Ihrer Absicht liegen kann.

Eine andere Auffassung meiner Aufgabe wäre folgende. Man kann die These verteidigen, daß es ein synthetisches Oxytocicum gibt und

zwar das natürliche Oxytocicum, das von Du Vigneaud synthetisierte cyclische Polypeptid Oxytocin. Formal gesprochen könnte ich also, indem ich ausführlich über Oxytocin spreche, meine Aufgabe vollbringen. Aus leicht verständlichen Gründen habe ich auch diese Möglichkeit nicht zu realisieren gewagt.

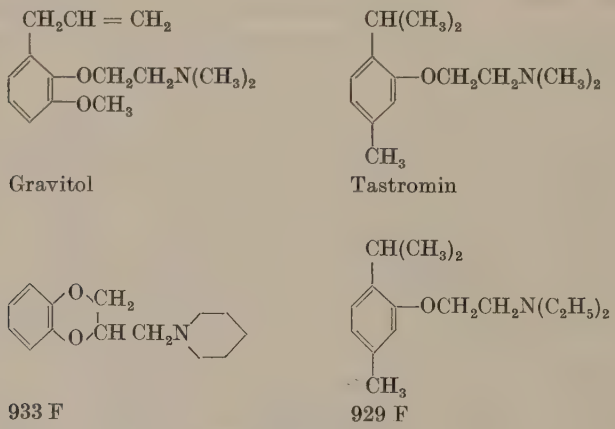
Wenngleich ich nicht näher auf das Oxytocin eingehen will, so muß ich diesen Stoff doch kurz erwähnen, da er die Modellsubstanz ist, welcher die synthetische Oxytocica, was ihre Wirkung betrifft, gleichen müssen. Oxytocin genügt als Oxytocicum der wichtigsten Anforderung, der ein Heilmittel genügen muß, nämlich der Anforderung der Spezifizität. Dieser Stoff kann den Uterus zu größerer Aktivität anregen, ohne Nebeneffekte wie Antidiurese, Blutdruckerhöhung oder Kontraktionen anderer Hohlorgane als des Uterus zu verursachen. Ein Syntheticum hat nur Chancen, wenn seine praktische Brauchbarkeit nicht weit unter der des Oxytocins liegt, und davon sind wir noch weit entfernt.

Bevor ich eine Übersicht über die Versuche gebe, die man angestellt hat, Stoffe, die man Oxytocica nennen könnte, zu synthetisieren, will ich zuerst einiges über den Begriff: synthetisches Oxytocicum bemerken. Er deckt sich nicht ganz mit dem Begriff Wehenmittel, der weniger umfassend ist. Ein Wehenmittel hat der Obstreticus nötig, wenn die Uteruskontraktionen durante partu zu schwach sind. Das souveräne Mittel ist dann stets Oxytocin. Mit dem Namen Oxytocicum bezeichnet man jedoch auch die Stoffe, die man gebraucht, um eine Uterusatonie post partum zu bekämpfen. Das unbestritten beste Mittel ist in diesem Falle Ergometrin. Nach den allgemeinen Auffassungen haben diese Oxytocica jeweils ihr eigenes Indikationsgebiet und man kann keines von beiden entbehren. Dies hat zur Folge, daß man versuchen muß, zwei Typen von synthetischen Oxytocica zu finden, einen, der die rhythmische Uterusaktivität erhöhen kann und Oxyticin zum Vorbild hat, und einen anderen, der den Uterus zu Tetanus bringen kann, wie es die Secale-Alkaloide tun.

Synthetische Oxytocica, die den Typ des Oxytocins nachahmen, bestehen überhaupt noch nicht, und es ist zweifelhaft, ob sie je bestehen werden. Andererseits sind bereits viele Versuche gemacht worden, oxytocische Effekte mit Stoffen von einfacher chemischer Struktur zu erreichen, die man sich von dem Ergobasinmolekül abgeleitet denken kann. Bevor ich darlege, welche Verbindungen in dieser Hinsicht untersucht und beschrieben worden sind, will ich jedoch die Frage aufwerfen, auf welche Weise man feststellt, ob ein Stoff oxytocische Wirkung besitzt. Dies ist die Frage nach dem experimentellen Auswertungsobjekt der oxytocischen Wirkung.

Die Pharmakologie des Myometriums ist äußerst kompliziert. Es gibt eingreifende Unterschiede zwischen den Tierspecies, die nur zum Teil bekannt sind. Die Reaktionen isolierter Stückchen Uterus weichen

mitunter stark von denen des intakten Organes in situ ab. Die endokrine Lage des Organismus ist von ausschlaggebender Bedeutung für den Effekt der Pharmaka. Ein gutes Beispiel liefert das Adrenalin. „Je nach Tierart und sexualhormonaler Beeinflussung", sagt Holtz, „treten Hemmungs-, Erregungs- und biphasische Wirkungen auf." Das Adrenalinbeispiel, das keine Ausnahme ist, macht es deutlich, daß man nicht ohne weiteres von einem Oxytocicum sprechen kann. Noch mehr als in vielen anderen Situationen in der Pharmakologie gilt hier, daß diese Definition nur mit Bezug auf eine bestimmte, genau zu umschreibende experimentelle Situation gilt. Dies hat zwei Konsequenzen. Zunächst die, daß die Ergebnisse verschiedener Untersucher, weil technische Uniformität fehlt, nicht ohne weiteres vergleichbar sind. Außerdem hat es zur Folge, daß die Übertragbarkeit der Ergebnisse der experimentellen Pharmakologie auf die humanen Verhältnisse gerade auf diesem Gebiet recht problematisch ist. Unter diesen Vorbehalten soll jetzt die Literatur über die synthetische Oxytocica referiert werden.



Formel 1. Oxytocisch wirksame Sympathikolytica aus der Gruppe der Phenoxyäther

Bei diesen Betrachtungen über synthetische Oxytocica werden wir immer wieder in Berührung kommen mit Pharmaka von augenscheinlich ganz anderer Art, nämlich den Sympathicolytica. Ich denke hierbei nicht nur an die Secale-Alkaloide, auch unter den sympathicolytischen Phenoxyäthern kommen einige vor, die sich einigermaßen Namen als Oxytocica erworben haben, nämlich Gravitol und Tastromin.

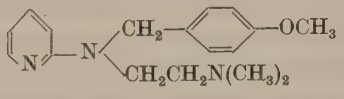
Über das Tastromin, das beinahe ausschließlich in Japan untersucht worden ist, ist es schwierig genaue Angaben zu erhalten, beim Gravitol verfügt man indes über eine Anzahl europäischer Daten. Barkan und Eichholz untersuchten es pharmakologisch, klinisch günstige Berichte

schrieben Schmidt, Podowka und Klatten, die jedoch nicht überzeugend sind. In der Literatur der letzten Jahrzehnte sind diese Stoffe wenig erwähnt worden. Im Zusammenhang mit dem folgenden verdient die Tatsache Beachtung, daß hier von alkylaromatischen Äthern die Rede ist, mit einiger, wenn auch geringer Wirkung auf den Uterus.

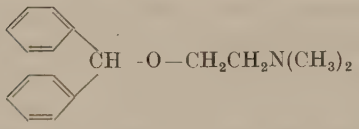
Eine andere Gruppe von Sympathicolytica, die gleichfalls einige Wirkung auf die Uterusmuskulatur haben, ist die der Benzodioxane. Das Dimethyl-Aminomethyl-Benzodioxan (883F) und das (N)-Piperidino-Methyl-Benzodioxan (933F) erhöhen beide den Tonus bei Kaninchen, Hunden und Katzen.

Eine dem Tastromin sehr nahe verwandte Verbindung ist das 929F, Thymoxyäthyldiäthylamin, das sich von Tastromin durch den Besitz einer Diäthylamin- anstatt einer Dimethylamingruppe unterscheidet. Dieser Stoff ist bekanntgeworden durch die französische Schule, die hierin einen ihrer Ausgangspunkte bei der Synthese von Antihistaminica gefunden hat. 929F hat eine nicht unbedeutende Antihistaminwirkung, die genügt, Meerschweinchen gegen die dreifache LD_{100} von Histamin zu beschützen. Nach Staub hat es ferner eine oxytocische Wirkung. Auch unter den Antihistaminica, die man später beschrieben hat und die keine Phenoxyäther sind, gibt es mehrere, die sich durch eine ziemlich kräftige Wirkung auf das Myometrium auszeichnen, eine Wirkung, die naturgemäß nicht spezifisch ist. Mayer sah z. B., daß außer 929F auch 1571F, ein Antihistaminicum des Äthylen-Diamin-Typs, uterusaktiv ist. Bovet u. Walthert (1) bemerken, daß Antergan und Neoantergan so stark auf das Myometrium wirken, daß man mittels des isolierten Meerschweinchen-Uterus die Antihistaminaktivität nicht nachweisen kann. Dews u. Graham konnten es unter ganz besonderen Dosisverhältnissen und zwar bei einer Konzentration von Neoantergan, die selbst nicht spasmogen wirkt. Halpern wies die Uteruswirkung bei einem weiteren Äthylen-Diaminderivates der Antihistaminreihe nach, dem 2325RP. Alle diese Urteile beziehen sich auf isolierte Uteri. Sherrod untersuchte die Uteruswirkung von Antihistaminica beim narkotisierten Hund. Die Äthylen-Diaminderivate Neoantergan und Pyribenzamin brachten beide den Uterus zur Kontraktion, der Benzhydryläther Benadryl tat dies dagegen nicht. Es läßt sich schwer aus diesen heterogenen und teilweise widersprechenden Angaben ein stichhaltiges Urteil ableiten. In einer Übersicht über Histaminica legt auch Loew hierauf Nachdruck. Er sagt mit Recht, man wird die Behauptungen und Meinungen, worauf jetzt die Beurteilung aufgebaut ist, durch quantitative Ergebnisse ersetzen müssen. In bezug auf die heutige Diskussion will ich bemerken, daß die oxytocische Komponente im Wirkungsbild einer Anzahl von Antihistaminica meines Wissens bisher nicht für die Suche nach Oxytocica gebraucht worden ist (Formel 2).

Schindler u. Voegtli (1, 2) sehen in der Piperidino-Methyl-Konfiguration des 933 F und einiger Verbindungen, die ich gleich nennen werde, ein wesentliches Kennzeichen oxytocisch wirksamer Substanzen



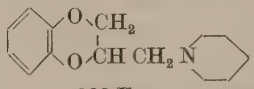
Neoantergan



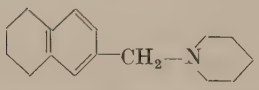
Benadryl

Formel 2. Oxytocisch wirksame Antihistaminica

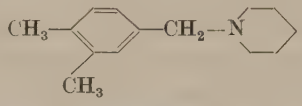
(Formel 3). Von den Stoffen, die sie anläßlich dieser Hypothese synthetisierten, ergab es sich, daß 2-(Piperidino-Methyl)-5,6,7,8,-Tetrahydronaphthalin und 4-(Piperidino-Methyl)-1,2-Dimethylbenzol tatsächlich



933 F



2-(N)-Piperidinomethyl (5,6,7,8) Tetrahydronaphthalen



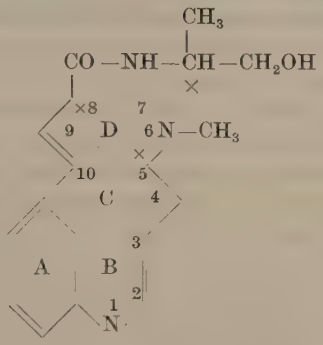
4—(N—Piperidinomethyl)—1,2—Dimethylbenzol

Formel 3. Oxytocisch wirksame Piperidino-Methyl-Derivaten

den isolierten Meerschweinchen-Uterus zur rhythmischen Kontraktion bringen können. In der entsprechenden quaternären Ammoniumbase zeigt sich merkwürdigerweise diese Aktivität unvermindert erhalten. In der Tetrahydronaphthalenserie bewirkt ein Ersatz des Piperidinringes durch die Diäthylaminogruppe eine Abnahme der Wirkung auf etwa die Hälfte, sie geht ganz verloren, wenn an die Stelle des N-Piperidino-Ringes ein N-Morpholino-Ring gesetzt wird. Es ist indes schwer, diese Ergebnisse zu interpretieren und sie in Zusammenhang zu bringen mit denen anderer Untersucher an ähnlichen Stoffen, solange keine weiteren Versuche als die am Uterus des Meerschweinchens in vitro vorliegen.

Unter den von Arnold u. Hjeno synthetisierten Benzylpiperidinen war am wirksamsten das 4-(N-Piperidino-Methyl)-1,2-Dimethoxybenzol. Auch hier fehlen ausführliche pharmakologische Daten.

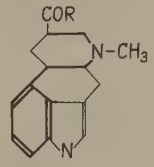
Die meisten Untersucher, die sich das Ziel setzen, ein synthetisches Oxytocicum zu finden, nahmen das Ergobasinmolekül als Modell (Formel 4). Wie dies bei Morphin und Tubocurarin geschah, suchte man hier-

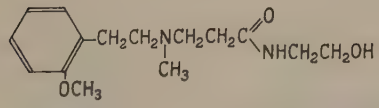


Formel 4. Ergobasin (Stoll)

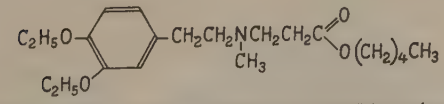
bei nach kleineren, der Synthese leichter zugänglichen Substrukturen, von denen man erwarten durfte, daß sie die Essenz der pharmakologischen Eigenschaften des Ergobasinmoleküls enthalten würden.

Baltzly sah Ergobasin als ein N-Methyl-N-Phenyläthyl-β-Alaninderivat (Formel 5). Er machte verschiedene derartige Verbindungen und





P-Äthanolamid des N-2-Methoxyphenyläthyl-N Methyl-β-Alanins

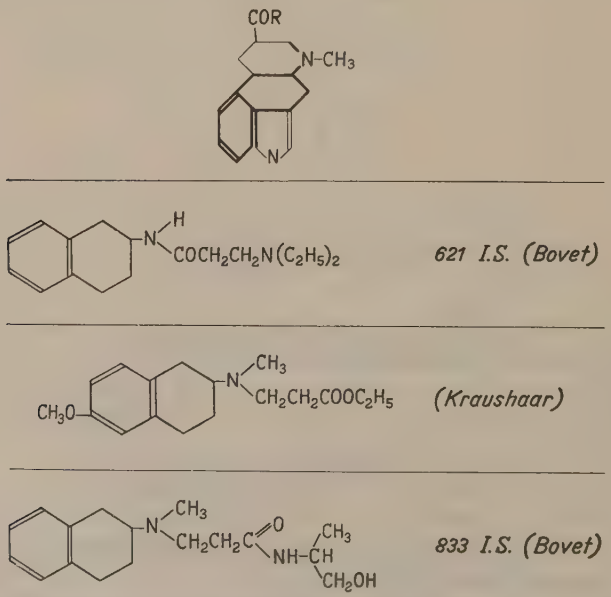


N-Amyl-Ester des N-Methyl-N-3-4-Diäthoxyphenyl-Äthyl-β-Alanins

Formel 5. Ergobasin als N-Methyl-N-Phenyläthyl-β.Alaninderivat (Baltzly)

kam zu der Schlußfolgerung, daß sich wenigstens 2 C-Atome zwischen dem Stickstoffatom und der Carbalkoxygruppe befinden müßten und daß die Einführung einer OH-Gruppe in die Seitenkette zwischen der Phenylgruppe und dem Stickstoffatom die Aktivität nicht erhöhe. Dagegen wird die Wirkung auf den Uterus offenbar durch die Einführung von Alkoxygruppen in den Benzolkern verstärkt. Die wirksamsten Verbindungen aus der Reihe von Baltzly haben eine 3,4-Diäthoxy-Konfiguration. Die Autoren denken an die Möglichkeit, daß eine solche Substitution am Benzolkern dieselbe Funktion haben könnte wie das Indolstickstoffatom in dem Alkaloid, das unter physiologischen Umständen, wie sie glauben, keinen Kationcharakter hat. Sehr aktiv waren die Stoffe übrigens nicht; die wirksamsten Verbindungen erreichten in vitro höchstens 0,1 der Wirksamkeit des Alkaloides.

Die Gruppe von Bovet in Rom sieht in dem Ergobasinmolekül die 2-(Tetrahydro-1,2,3,4-Naphthyl)-Amin-Konfiguration (THN) als wichtig an [Marini-Bettolo (1, 2); Rodriguez-Bravo; Bertini; Bovet (1, 2); Bovet-Nitti]. Sie untersuchte ungefähr 200 Verbindungen dieses Typs speziell auf den Blutdruck und die Uterusmotilität und glaubt bewiesen zu haben, daß der β-Tetrahydronaphthylaminkern für die pharmakologische Wirksamkeit der Secale-Alkaloide wesentlich ist (Formel 6). Das β-Tetrahydronaphthylamin selber hat eine periphere sympathicomimetische Wirkung und einen zentralstimulierenden Effekt, der sich in



Formel 6. Ergobasin als 2 (Tetrahydro 1-2-3-4-Naphthyl)-Amin-Derivat

Erscheinungen wie Erregung und Hyperthermie äußert. Hohe Dosierungen wirken am chloralosenarkotisierten Hund gleichzeitig adrenolytisch. Substitution der Aminogruppe verstärkt die sympathicolytischen Effekte. Das Diäthylamin (843 I. S.) verursacht z. B. durch diesen Wirkungsmechanismus eine Blutdruckerniedrigung bei dem mit Chloralose narkotisierten Hund. Das Bild wird jedoch durch zentrale Reizerscheinungen, die beim wachen Hund überwiegen, kompliziert: hierdurch treten Hypertension und Tachykardie in den Vordergrund.

Die vasomotorischen und analeptischen Erscheinungen treten in den von β-Tetrahydronaphthylamin abgeleiteten Diaminen schärfer hervor. Von mehr Bedeutung für die heutige Diskussion sind die Amidoamine, unter denen außer typischen Sympathicolytica Stoffe vorkommen, bei denen die oxytocische Wirkungskomponente überwiegt. 621 und 833 I.S. sollen die wirksamsten sein. Sie enthalten das Strukturelement, das die Autoren als unentbehrlich für die oxytocische Aktivität betrachten, die Amino-Amidokette $NRCOCHNR'R''$. Über 621 I. S. erschienen einige klinische Veröffentlichungen. In einer ausführlichen experimentellen Studie über diesen Stoff weist Bovet-Nitti darauf hin, daß die pharmakologische Untersuchung der Oxytocica wegen der Unregelmäßigkeiten der Ergebnisse schwierig ist. Es gibt Uteri, die auf kein einziges Oxytocicum, auch nicht auf die stärksten, reagieren. Dies hat zusammen mit den großen Unterschieden zwischen den Species zur Folge, daß nur eine ausgedehnte klinische Erfahrung über die Frage entscheiden kann, inwieweit 621 I. S. in der humanen Obstetrie brauchbar ist.

Von deutscher Seite wurde das Thema der β-Tetrahydronaphthylaminderivate von Kraushaar bearbeitet. Er untersuchte eine Reihe Amine, die an der 6-Stelle in dem Naphthalinring mit einer Hydroxylgruppe oder, in einer Anzahl von Fällen, mit einer Methoxygruppe substituiert waren (s. Formel 6). Er registrierte bei Kaninchen gleichzeitig den Blutdruck, die Atmung und die Motilität von Uterus und Jejunum. Auf diese Weise konnte er einen Eindruck von der Spezifität der oxytocischen Effekte bekommen. Die Ergebnisse zeigen, daß das unsubstituierte β-Tetrahydronaphthylamin bereits eine — wenn auch kurz anhaltende — Uteruskontraktion gibt, die aber mit einer Bronchokonstriktion und Hemmung der Atmung und einer mäßig reversiblen Blutdruckerniedrigung einhergeht. Führt man eine Methylgruppe in die Aminogruppe ein, dann verschwinden die Effekte auf den Uterus und die Atmung praktisch völlig, die auf den Blutdruck sind viel geringer geworden. Uterus- und Blutdruckeffekte kommen beide zurück, wenn man in diese Verbindung eine Hydroxygruppe in 6-Stellung einführt. Merkwürdigerweise tritt dann zugleich eine ausgesprochene Hemmung der Darmmotilität auf. Der Uteruseffekt dauert nur kurz. Der Nebeneffekt auf die Atmung ist auch hier einigermaßen vorhanden. Wenn man

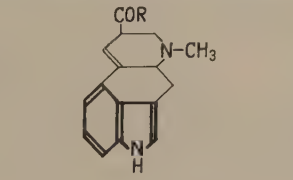
in der Methylamino-Verbindung die OH-Gruppe durch eine Methoxygruppe ersetzt, bleibt der Uteruseffekt nicht nur gleich stark, sondern dauert überdies viel länger; der Effekt auf den Darm ist dagegen ganz verschwunden. Es besteht überdies noch immer ein flüchtiger Initial-Bronchospasmus, auf den eine Periode der Hyperventilation folgt. Noch länger dauert der Uteruseffekt in dem entsprechenden primären Amin, das übrigens auf den Darm, den Blutdruck und die Atmung dieselben Wirkungen hat. Interessant scheint uns vor allem die starke Zunahme der Uterus-Spezifizität durch den Übergang von der 6-HO- in die 6-OCH_3-Substitution. Diese Beobachtung ist so wichtig, daß Bestätigung in anderen Laboratorien dringend angezeigt scheint.

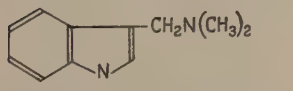
Den umgekehrten Einfluß, Schwächung des oxytocischen Effektes und Erhöhung des Darmeffektes hatte die Umwandlung der Aminogruppe in die Dimethylaminogruppe. Die Effekte auf die Atmung und die Zirkulation waren gleichzeitig geringer als in dem primären Amin. Merkwürdig ist, daß eine Substitution der Aminogruppe, die der Konfiguration des Ergobasinmoleküls scheinbar näherkommt, bewirken kann, daß der oxytocische Effekt ganz verschwindet. Dies war der Fall, als das 6-Methoxy-Aminotetrahydronaphthalin an der Aminogruppe substituiert wurde, entweder mit $CH_2CH_2COOCH_5$ allein oder mit dieser Gruppe und der Methylgruppe. Man fragt sich, mit Rücksicht auf die Resultate aus der Schule von Bovet, ob vielleicht in dieser Konfiguration die 6-Methoxy-Substitution für die oxytocische Wirkung ungünstig sei und ob die 6-Methoxy-Substitution Einfluß auf die Aminoamidverbindungen aus der italienischen Schule hätte. Es sei außerdem an die Beobachtungen und die Spekulationen von Baltzly und Mitarbeitern erinnert und der Bedeutung, die sie den Alkoxysubstitutionen im Benzolkern zumessen. Wie dem auch sei, die wirksamste Verbindung, die Kraushaar bis jetzt gefunden hat, ist das 2-Amino-6-Methoxy-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin, dessen wirksame Dosis gemäß seiner Veröffentlichung, am Kaninchen bei ungefähr 2 mg/kg intravenös liegt.

Man kann in dem Ergobasinmolekül auch den Indolkern als bedeutsames Grundelement ansehen und sich fragen, inwieweit die oxytocische Wirksamkeit von Ergobasin vielleicht in synthetisch zugänglichen Indolderivaten bewahrt bleibt. Von diesem Gedanken braucht man sich nicht durch die Erwägung abhalten zu lassen, daß zufolge der Untersuchungen von Izquiendo u. Stoppani Indol selbst und auch Skatol auf den Uterus der Ratte in vitro hemmend wirken. Andere Tiere und sogar die intakten Ratten könnten sich anders verhalten, außerdem sind synthetische Indolderivate zur Genüge bekannt, die den Uterus aktivieren, so das von Powell u. Chenn untersuchte Dimethylamino-Methyl-Indol (= Gramin). Es stimuliert den isolierten Uterus von Kaninchen, Meerschweinchen und Hamster. Wir konnten dies bestätigen, auch für den

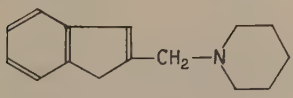
isolierten Uterus der Ratte und den Uterus in situ des Kaninchens, wenngleich der Effekt nur einen Bruchteil desjenigen von Ergobasin betrug.

Etwas weiter von dem Ergobasinmodell entfernt als Indolderivate stehen die Abkömmlinge des Indan und Inden, die von Hoffmann u. Schellenberg untersucht wurden. Die Indenderivate waren inaktiv. Auffallende Wirksamkeit auf den isolierten Meerschweinchen-Uterus zeigten Dialkylamino-Indanderivate, besonders die N-Piperidino-Verbindung. Eine Wirksamkeit in vivo wird jedoch nicht erwähnt, so daß diese Angaben als Einzelbefunde und ohne deutlichen Zusammenhang mit anderen Angaben betrachtet werden müssen (Formel 7).





Gramin (Powell u. Chen)



2-(N-Piperidino-Methyl) Inden (Schellenberg)

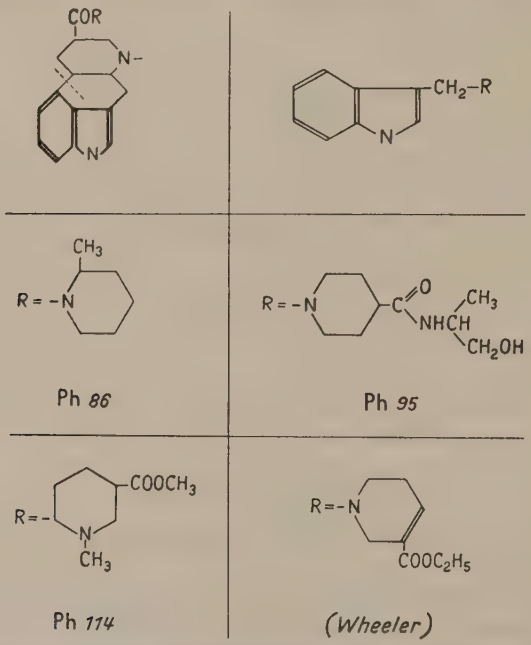
Formel 7. Ergobasin als Indolderivat

Die in Amsterdam tätige chemische Gruppe von Veldstra und die pharmakologische Gruppe von de Jongh sind bei ihren Untersuchungen über synthetische Oxytocica von den Naturstoffen Ergobasin und Chinin ausgegangen. [Akkerman, de Jongh u. Veldstra (1); de Jongh u. van Proosdij-Hartzema (2); van Proosdij-Hartzema u. de Jongh (3); Akkerman u. Veldstra (2); Pouwels u. Veldstra.] Wenn ich jetzt ausführlich bei diesen Untersuchungen verweile, dann geschieht dies ausschließlich, weil ich über die Details derselben besser auf dem Laufenden bin als über die Arbeiten anderer Pharmakologen.

In Voruntersuchungen war die oxytocische Aktivität von Chinin in vitro und in vivo analysiert und die Realität dieses Effektes festgestellt worden, wobei das Fehlen von Spezifizität deutlich zutage trat. Es wurde versucht, neben der oxytocischen Aktivität auch die Spezifität in einer

Zahl auszudrücken. Hierfür wurde das Verhältnis der Wirksamkeit auf den isolierten Uterus des Meerschweinchens im Vergleich mit der Wirksamkeit auf den isolierten Darm des Meerschweinchens für alle Stoffe bestimmt. Nimmt man das Verhältnis in dem Fall von Ergobasin als Maßstab, so kann man jedem Stoff in dem definierten Sinn einen Spezifizitätsindex zuerkennen, wobei zugegeben ist, daß ein solcher Index nur eine begrenzte Bedeutung hat.

Den chemischen Ausgangspunkt bildete die Auffassung des Ergobasinmoleküls als ein geschlossenes 3-(Piperidyl(2)-Methyl)-indol (Formel 8). Öffnung dieser Struktur ergibt 3-(Piperidyl(2)-Methyl)-Indole. Daneben wurden N-gekoppelte Methyl-Piperidino-Indole untersucht.



Formel 8. Ergobasin als geschlossenes Piperidyl-Methyl-Derivat

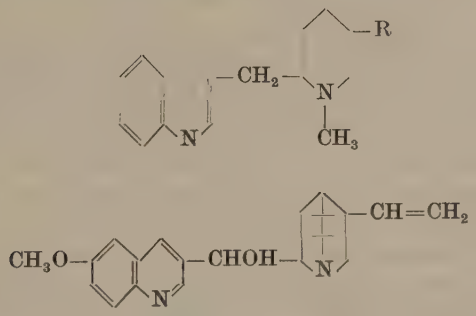
Wir fanden, daß bereits ein einfacher Indol-Abkömmling wie 3-Piperidyl(N)-Methylindol eine deutliche oxytocische Aktivität, gekennzeichnet durch ein ziemlich großes Maß an Spezifität, besitzt. In oxytocischen Dosierungen verändert dieser Stoff den Blutdruck und die Atmung nicht. Einführung von Alkylgruppen in den Piperidinkern vergrößerte in einigen Fällen die Aktivität auf die Gebärmutter. Die Maximalwirksamkeit, in intakten Kaninchen ungefähr $^1/_3$ von der Aktivität des Ergobasins, erhielt man in 3-(2′,6′-Dimethyl-Piperidyl(N)-Methyl)-Indol. Diese Verbindung ist jedoch in wäßriger Auflösung instabil.

Es ergab sich, daß das aktivste unter den stabilen Derivaten das 3-(2′-Methyl)-Indol (Ph. 86) war. Diesem Stoff kam ein Spezifitätsindex 10 zu. Die Wirksamkeit beträgt beim Kaninchen in vivo ungefähr $\frac{1}{4}$ von der des Ergobasins, und der oxytocische Effekt ist spezifisch.

Es erwies sich nicht als möglich, die Uterusaktivität durch Substitutionen am Piperidinkern in Analogie zur Struktur der natürlichen Secale-Alkaloide zu steigern. Es ergab sich sogar, daß N-(Indolyl(3)-Methyl)-Isonicotinsäure-(+)-Propanolamid-(2′) (Ph. 95), das im Säure-Amidrest dem Ergobasin entspricht, sowohl den isolierten Uterus des Meerschweinchens wie auch den Uterus in vivo des Kaninchens hemmt.

Es zeigte sich weiter, daß die 3-(Piperidyl(2)-Methyl)-Indole, bei denen die Koppelung des Indolkerns an den Piperidinring „korrekt" ist, weniger aktiv sind als die soeben genannten „verkehrt" gekoppelten 3-(Piperidyl(N)-Methyl)-Indole.

Auf Grund einer gewissen strukturellen Verwandtschaft zwischen den auf diese Weise geöffneten Secale-Alkaloiden und Chinarinde-Alkaloiden (Formel 9) wurde weiterhin untersucht, ob eine Reduktion



Formel 9. Analogie zwischen „Geöffnete" Mutterkorn- und Cinchona-Alkaloiden

der CHOH-Brücke im Molekül der Chinarinde-Alkaloide zu CH_2 die oxytocische Aktivität erhöhen kann, weil auf diese Weise die Ähnlichkeit zu den Indolderivaten vergrößert wird. Es zeigte sich, daß dies nicht der Fall war. Weder die 9-Chloro-Verbindungen noch die 9-Desoxy-Verbindungen der 4 Hauptalkaloide unterscheiden sich in ihrer oxytocischen Wirksamkeit von diesen Alkaloiden selber. Nebenbei sei bemerkt, daß durch diesen Eingriff die Antimalaria-Aktivität des Chinins ganz verschwindet. Es ist also möglich, durch einfache Eingriffe in das Molekül die oxytocischen und die antiprotozoären Wirksamkeit voneinander zu trennen. Ebenso ist es möglich, wie sich aus den Untersuchungen von Bovet ergibt, in der Serie der Amino-Tetrahydronaphthalinderivate die oxytocische Aktivität von der sympathicolytischen loszumachen. Ob

durch die Reduktion der 9-OH-Gruppe in dem Chininmolekül die sympathicolytische Wirksamkeit verlorengeht, wissen wir noch nicht. Wohl haben wir nachweisen können, daß Oxydation der Vinyl-Seitenkette zu einer Carboxylgruppe die Desoxybasen ihrer oxytocischen Wirkung beraubt. Vielleicht kann man hier eine Analogie mit dem Effekt der Substitution einer Carboxylgruppe in dem Piperidinkern der obengenannten Synthetica erblicken. Auch hier ging dadurch die oxytocische Wirksamkeit verloren.

Für Ph. 86 verfügen wir über eine breitere klinische Erfahrung. Es sei mir gestattet, die Ergebnisse von Untersuchungen in Leiden, Zürich, Paris und Indianapolis kurz zusammenzufassen, nicht weil ich diesen Stoff für so wichtig halte, sondern weil diese Untersuchung einige Tatsachen ans Licht gebracht hat, die für Forscher, welche sich auf dieses schwierige Gebiet begeben wollen, von Bedeutung sein können. Mittels tokographischer Methoden ist festgestellt worden, daß Ph. 86 auch bei dem Menschen eine spezifische oxytocische Wirksamkeit entfaltet. Dosen, die den Uterus zur Kontraktion bringen, stören nicht die Pulsfrequenz, den Blutdruck oder die Atmung, und ebensowenig verursachen sie subjektive Erscheinungen irgendwelcher Art. Wichtiger scheint uns, daß Ph. 86 trotz seiner chemischen Verwandtschaft mit dem Ergobasin nicht wie dieser Stoff den Uterus zu einer tetanischen Kontraktion bringt, sondern Kontraktionen beim Menschen verursacht, die rein rhythmischer Art sind: zwischen den Kontraktionen erschlafft der Uterus vollständig. Meiner Meinung nach ist dies ein überraschendes Ergebnis, weil das Suchen nach einem ergometrinartigen Oxytocicum einen rein oxytocinartigen Stoff geliefert hat. Selbst mit enormen Dosen Ph. 86 intravenös gelingt es beim Menschen nicht, den Uterus in einen bleibenden Kontraktionszustand zu bringen, ganz im Gegenteil zum Kaninchen, bei dem man leicht einen Tetanus Uteri durch Ph. 86 verursachen kann. Ein anderer Speciesunterschied dieses Stoffes äußert sich in dem Aktivitätsverhältnis zwischen Ergometrin und Ph. 86. Es beträgt bei dem Kaninchen ungefähr 4, bei dem Menschen jedoch viel mehr, nach roher Schätzung sicher 100! Beim Menschen ist jedoch nicht nur die Dosis viel größer als beim Kaninchen, auch die maximal erreichbare Wirkung ist meist schwächer, so daß der maximal erreichbare Effekt viel geringer ist als die gewaltige Uterusaktivität, die man mit Oxytocin oder Ergobasin erzielen kann.

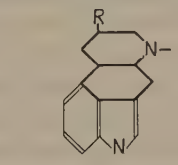
Das Schätzen der Aktivitätsverhältnisse von Stoffen mit qualitativ vergleichbarer Wirkung ist oft schon rein pharmakologisch eine sehr schwere Aufgabe. Aus dem soeben gegebenen Beispiel ersieht man deutlich, daß es überdies gefährlich ist, Schätzungen, die man durch Untersuchungen bei Versuchstieren bekommen hat, ohne weiteres auf die Klinik zu übertragen. Es sei mir gestattet, nebenbei ein anderes Beispiel

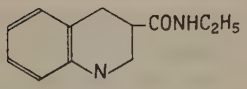
aus eigener Erfahrung anzuführen, das denselben Stand der Dinge erläutert. In großen Untersuchungsreihen an Kaninchen hatten wir festgestellt, daß der Äthyläther von 2,2-bis-(4-Oxy-cumarinyl-3)-älthanol als Antikoagulans bei Kaninchen rund 20mal aktiver ist als Äthylbiscumacetat [DE JONGH u. KOK (4, 5)]. Auch beim Menschen ergab sich die erste Verbindung als aktiver als die zweite. Aus klinischen Erfahrungen von DEKKER u. GROEN (1, 2), die mit späteren Erfahrungen übereinstimmen, kann man indes ableiten, daß das Aktivitätsverhältnis hier nur etwa 3—4 beträgt. Aufs neue also ein enormer Unterschied zwischen denselben zwei Species.

Ein Versuch, der mit dem vorigen verwandt ist, relativ einfache Analoge von Ergobasin zu machen, wurde von WHEELER c. s. unternommen. Sie arbeiteten mit einem unvollständig hydrierten Pyridinring bei sonst gleicher Grundstruktur und synthetisierten den Äthylester von 1-(3-Indolyl-Methyl)-Guvacin (s. Formel 8).

Es fehlen jedoch genauere pharmakologische Angaben. Auch mißlang es, eine getreuere Nachahmung des Ergobasins zu erreichen, wie sie etwa der Ersatz der Äthoxygruppe durch eine Alkanol-Amidgruppe darstellen würde.

KOELLE u. KAMIJO synthetisierten eine Reihe von Chinolinderivaten, da in dem komplizierten Ergobasin außer vielen anderen Strukturen auch dieser Kern zu finden ist (Formel 10). Sie machten 3 Gruppen von





MCN 240 (Koelle u. Kamajo)

Formel 10. Ergobasin als Chinolinderivat

Verbindungen mit geringer oxytocischen Wirksamkeit in der Reihe der Tetrahydro-3-Chinolin-Carboxamide. Am besten wirkte MCN 240, dessen Aktivität jedoch nach den Autoren sehr gering genannt werden muß. Verlängerung der Säure-Amidkette ergab keine Verbesserung der Aktivität.

Hiermit bin ich am Ende meiner Aufzählung der synthetischen Oxytocica angelangt. Wie ich am Anfang meines Vortrages bereits mitteilte, habe ich diesen Begriff sehr weit nehmen müssen, um überhaupt imstande zu sein, über Synthetica auf diesem Gebiet zu sprechen. Die allgemeine Schlußfolgerung aus dieser Übersicht ist insgesamt wohl diese, daß bis jetzt kein einziges vollwertiges synthetisches Ersatzmittel für Oxytocin oder für Ergometrin bekannt ist, obwohl dieses Problem bereits von vielen Forschern und von verschiedenen Seiten angefaßt wurde. Man kann sich deshalb fragen, ob sich überhaupt auf Grund unseres heutigen Wissens die Möglichkeit abzeichnet, doch noch solche Verbindungen zu finden. Sicher ist nur, daß dies nicht einfach sein wird. Es ist wahrscheinlich, daß der Uterusmuskel ziemlich spezielle Affinitäten besitzt. Die Natur hat offenbar Maßnahmen getroffen, um den Embryo gegen jede chemische Aggression zu schützen, die gegen das Organ gerichtet ist, worin er seine Entwicklung vollziehen muß. Darauf beruht es auch, daß es, soweit wir wissen, kein einziges Abortivum gibt. Es gibt beinahe keine Stoffe, die in nichttoxischen Dosierungen den schwangeren Uterus zur Kontraktion bringen können, wenn dieses Organ nicht bereits selber in Bereitschaft ist, zur Kontraktion überzugehen. Dies gilt sicher für das physiologische Oxytocicum aus dem Hypophyse-Hinterlappen. Ich glaube nicht, daß man mit seiner Hilfe die Barriere der endokrinen Beschützung des graviden Myometriums durchbrechen kann. Es ist wahrscheinlich, obwohl es meines Wissens nicht ausführlich untersucht worden ist, daß der Ergobasineffekt weniger von der Anwesenheit anderer Pharmaka abhängig ist als der des Oxytocins. Wie dem auch sei, die ganz besonderen Eigenschaften der Uterusmuskeln erklären sicher zum Teil, daß es schwer sein muß ein Oxytocicum zu finden, andererseits wird damit die prinzipielle Möglichkeit einer sehr weitgehenden Spezifizität erklärt, welche im Falle des Oxytocins realisiert ist.

Noch kurz ein paar Worte über die Methode, nach der man bisher beim Suchen nach synthetischen Oxytocica gearbeitet hat. Diese ist notgedrungen eine rein empirische gewesen. Es standen ja bisher bei den Versuchen, spezifische Reizstoffe für das Myometrium zu finden, keine Sachkenntnisse zu Gebote in betreff der spezifischen Eigenschaften dieses besonders gearteten Muskels. Außerdem sind nur zwei Stoffe bekannt, die eine große Affinität zu dem Myometrium zur Schau tragen. Allein die vollständige Kenntnis des Chemismus der Uterusmuskelkontraktion und der Besonderheiten, worin dieser von anderen glatten Muskeln abweicht, würde aber eine ideale Basis liefern, um nach synthetischen Oxytocica zu suchen. Solange man nicht über diese Kenntnisse verfügt, ist man auf die bisher angewendete Methode „trial and error" angewiesen, die der Pharmakologe auch anderswo anwendet. Sobald der Chemiker die Struktur eines physiologisch aktiven Stoffes

geklärt hat, versucht er innerhalb des Gesamtmoleküls den Bestandteil zu finden, von dem anzunehmen ist, daß darin die Essenz der Wirksamkeit liegt, um auf diese Weise zu einfachen Stoffen zu gelangen, die das gleiche bewirken. Durch Variationen und Umwandlungen dieser Grundstruktur erhält er dann manchmal tatsächlich Stoffe von merkwürdig großer Aktivität, wie Methadon und Dolantin als Ersatzmittel für Morphin, die synthetischen Antimalariamittel und die synthetischen curarisierenden Stoffe. Oft fragt man sich bei der Betrachtung des Endergebnisses, was schließlich von der strukturellen Verwandtschaft übriggeblieben ist, von der der Chemiker ursprünglich ausgegangen ist und die er auf eine für den Pharmakologen oft nicht ganz überzeugende Weise zwischen dem Ausgangsstoff und den aktivsten Synthetica nachzuweisen versucht. Es ist vor allem deshalb nicht überzeugend, weil Stoffe, die scheinbar viel mehr den Ausgangsstoffen gleichen als die aktivsten Synthetica, sich in vielen Fällen als ganz unwirksam herausstellen. Die Erklärungen, die es darüber wohl gibt, sehen mitunter nach Hypothesen ad hoc aus. Wenn darin irgendein Kern der Wahrheit steckt, würde es darauf hinauslaufen, daß Stoffe vor allem dann strukturverwandt genannt werden können, wenn sie pharmakologisch verwandt sind. Der chemische Strukturbegriff würde in diesem Falle sich nicht mehr ausschließlich auf die Beschreibung der gegenseitigen Lage der Atome und Atomgruppen im Raume beschränken, er würde mit pharmakologischen Motiven behaftet sein. Insoweit dies wahr ist, würde es zu einem circulus vitiosus führen, wenn man von einem Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und physiologischer Aktivität spräche.

Dies alles ist keineswegs als niederreißende Kritik beabsichtigt. Ich will selbstverständlich den heuristischen Wert des Strukturbegriffes, womit der Chemiker arbeitet, nicht in Abrede stellen. Ich habe nur auf den stark hypothetischen Charakter hinweisen wollen, der die Basis der modernen chemischen Pharmakologie mitunter kennzeichnet. Der Chemiker ist bisweilen gezwungen, sich von der tatsächlichen Basis ziemlich weit zu entfernen, wenn er weiterkommen will. Die Weise, wie er sinnvolle Substrukturen in großen Molekülen entwirrt, erinnert uns mitunter an die Art und Weise, wie Kinder und Dichter Gesichter oder Tiere in Wolkengebilden sehen. Daß dieses in unserem Falle indes eine legitime Tätigkeit ist, ergibt sich aus den Resultaten, welche die Zusammenarbeit zwischen Chemikern und Physiologen gezeitigt hat, seitdem der große Paul Ehrlich einen Anfang damit machte. Die pharmakologische Forschung ist u. a. gerade hierdurch zu einem außergewöhnlich interessanten Abenteuer geworden, das ich ohne Zögern mit dem Ausspruch qualifiziere, den Starling tat, um die Physiologie zu kennzeichnen, nämlich „the biggest game in the world".

Literatur

(1) Akkerman, A. M., D. K. de Jongh und H. Veldstra: Rec. Trav. chim Pays-Bas (Amsterd.) **70**, 899 (1951). — (2) Akkerman, A. M., u. H. Veldstra: Rec. Trav. chim. Pays-Bas (Amsterd.) **73**, 629 (1954). — Arnold, Z., u. K. Hejno: Chem. Listy **47**, 601 (1953). — Baltzly, R., and A. P. Philips: J. Amer. Chem. Soc. **71**, 3419, 3421 (1949). — Barkan, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **167**, 84 (1932). — Bertini, M.: Rendic. Ist. Super. San. **15**, 1033 (1952). — (1) Bovet, D., et F. Walthert: Ann. pharm. franç. **2**, supplement, 1 (1944). — (2) Bovet, D., F. Bovet-Nitti, L. Sollero u. G. B. Marini-Bettolo: Experientia (Basel) **7**, 232 (1951). — Bovet-Nitti, F.: Rendic. Ist. Super. San. **15**, 953, 989 (1951). — Cohen, A., and H. King: Proc. Roy. Soc. Lond. **125** B, 49 (1938). — (1) Daels, J.: Arch. internat. Pharmacodynamie **61**, 113 (1939). — (2) Arch. internat. Pharmacodynamie **63**, 359 (1939). — (3) C. r. Soc. Biol. (Paris) **123**, 989 (1936). — (4) C. r. Soc. Biol. (Paris) **127**, 1109 (1938). — (5) Daels, J., et H. Handovsky: C. r. Soc. Biol. (Paris) **126**, 428 (1937). — (1) Dekker, E., u. J. Groen: Nederl. Tijdschr. Geneesk. **98**, 1928 (1954). — (2) Proc. I. Int. Conf. Thromb. Emb., S. 221. Basel 1954. — Dews, P. B., and J. D. P. Graham: Brit. J. Pharmacol. **1**, 278 (1946). — Eichholz, F.: Münch. med. Wschr. **75**, 1281 (1928). — Greeff, K., et P. Holtz: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 228 (1951). — Halpern, B. N.: Arch. internat. Pharmacodynamie **68**, 339 (1942). — Hoffmann, K., u. H. Schellenberg: Helvet. chim. Acta **27**, 1782 (1944). — Izquierdo, J. A., and A. O. M. Stoppani: Brit. J. Pharmacol. **8**, 389 (1953). — Jongh, D. K. de, E. G. van Proosdij-Hartzema et A. Th. Knoppers: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 82 (1951). — (2) de Jongh, D. K., and E. G. van Proosdij-Hartzema: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **105**, 130 (1952). — (3) Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 270 (1954). — (4) de Jongh, D. K., et K. Kok: Arch. internat. Pharmacodynamie **94**, 470 (1953). — (5) Proc. I. Int. Conf. Thromb. Emb. Basel (1954) S. 227. — Kaer, E., u. G. Barkani: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **170**, 111 (1933). — Klatten, E.: Med. Klin. **25**, 949 (1929). — Koelle, G. B., and K. Kamijo: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 444 (1954). — Kraushaar, A.: Arzneimittel-Forsch. **4**, 273 (1954). — Loew, E. R.: Physiologie. Rev. **27**, 542 (1947). — (1) Marini-Bettolo, G. B., S. Chiavarelli e D. Bovet: Gazz. chim. ital. **80**, 281 (1950). — (2) Marini-Bettolo, G. B., S. Chiavarelli e F. Bovet-Nitti: Gazz. chim. ital. **81**, 587 (1951). — Maijer, R. L.: J. Allergy **17**, 153 (1946). — Podowka, R.: Dtsch. med. Wschr. **1929**, 1093. — Pouwels, H., et H. Veldstra: Recueil. Trav. Chim. Pays-Bas **74**, 795 (1955). — Powell, C. E., and K. K. Chen: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **58**, 1 (1945). — (1) Proosdij-Hartzema, E. G. van, u. D. K. de Jongh: Acta physiol. et pharmacol. Neerl. (Amsterd.) **3**, 173 (1954). — (2) Arch. internat. Pharmacodynamie **98**, 320 (1954). — (3) Arch. internat. Pharmocadynamie **98**, 335 (1954). — Rodriguez-Bravo, R.: Rendic. Ist. Super. San. **15**, 1008 (1952). — (1) Schindler, O., u. W. Voegtli: Pharm. Acta Helvet. **24**, 207 (1949). — (2) Experientia (Basel) **5**, 248 (1949). — Schmidt, P., u. F. Scholl: Münch. med. Wschr. **75**, 1283 (1928). — Sherrod, T. R., E. R. Loew and H. F. Schloemer: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **89**, 247 (1947). — Staub, A. M.: Ann. Inst. Pasteur. **63**, 400, 485 (1939). — Wheeler, F. C., G. L. Jenkins and G. E. Cwalina: J. Amer. Pharmaceut. Assoc. **11**, 589 (1951).

Diskussion

Heubner (Heidelberg): Die verschiedene Empfänglichkeit der Uteruskontraktion im Verlaufe des Cyclus für bestimmte chemische Substanzen ist voll anerkannt. Nach gewissen Beobachtungen habe ich den Eindruck gewonnen, daß zu

solchen prädisponierenden, nicht unmittelbar erregenden Substanzen auch das Chinin gehört, daß es sich also im Wirkungstypus von den Mutterkornalkaloiden usw. unterscheide. Ist diese Ansicht unzutreffend?

Eichholtz (Heidelberg): Erwähnt die unvergänglichen Verdienste von Fourneau auf diesem Gebiete. Fragt an, durch welche neuere Stoffe Gravitol als oxytocische Substanz übertroffen wird?

Schlußwort. De Jongh zu Heubner: Stichhaltige experimentelle Gründe für diese Auffassung sind dem Referenten nicht bekannt. Unter anderem spricht dagegen, daß es praktisch immer möglich ist, mittels Chinin den Uterus zur Kontraktion zu bringen.

Zu Eichholtz: Ein direkter klinischer Vergleich zwischen dem Gravitol und modernen oxytocischen Substanzen chemischer Herkunft ist meines Wissens nicht gemacht worden. Die Frage kann also weder bejaht noch verneint werden.

C. Einzelvorträge

W. Usinger und C. Albers (Bad Nauheim): Die Regulierung der Atmung beim Wärmehecheln

Die typische Cheyne-Stokessche Atmung kann unter sehr verschiedenen Bedingungen auftreten, denen jedoch gemeinsam die gleiche Umstellung in der Atemregulierung zugrunde liegt: An Stelle der unmittelbar zentral angreifenden Kohlensäure steuert dann die Sauerstoffspannung über die Chemoreceptoren die Atmung; sei es, daß die CO_2-Spannung unterschwellig ist wie bei der hypoxischen Hyperventilation (Opitz), sei es, daß das Atemzentrum gegenüber der Kohlensäure weniger empfindlich ist wie etwa bei Überdosierung von Barbituraten im Tierversuch (Åström). In all diesen Fällen handelt es sich um *pathologische* oder *abnorme* Vorgänge.

Der beschriebene Führungswechsel in der Atemregulierung kann sich jedoch auch unter *physiologischen* Bedingungen ereignen, wie am Beispiel des Wärmehechelns des Hundes gezeigt wird. Während des Wärmehechelns konnten bei unnarkotisierten Carotisschlingenhunden mehrfach typische Cheyne-Stokes-Perioden beobachtet werden, bei denen die Atemfrequenz regelmäßig zwischen 240 und 90 pro Minute und die arterielle Sauerstoffsättigung entsprechend zwischen 85 und 90% schwankte. Der Beginn der langsameren und tieferen Atemzüge fiel zeitlich in den absteigenden Schenkel der Sättigungskurve, die etwa 3 sec später wieder anzusteigen begann. Stärkere Blutdruckschwankungen traten nicht auf.

Da die Periodik schon durch geringe äußere Reize (Berührung, halblautes Sprechen) zu unterbrechen war, konnten nur Untersuchungsmethoden angewandt werden, die den Ablauf derart empfindlicher physiologischer Vorgänge nicht beeinträchtigen, wie die fortlaufende Registrierung der Sauerstoffsättigung an der Carotisschlinge nach Albers u. Brendel und die Blutdruckschreibung nach Schröder. Auf Blutgasanalysen und die Verwendung von Atemmasken zur Bestimmung des Atemvolumens und für die Analyse von Exspirations- und Alveolarluft mußte daher verzichtet werden.

Für die *Erklärung* des Phänomens scheidet eine Hyperventilationsakapnie etwa in Analogie zu der periodischen Atmung bei Hypoxieversuchen aus, da bei der bestehenden Untersättigung die alveolare Ventilation sicher erniedrigt und damit die CO_2-Spannung des arteriellen Blutes erhöht anzunehmen ist. So fanden auch Lamy u. Arnould bei narkotisierten Hunden während des Wärmehechelns eine Erniedrigung des Atemvolumens um 60%. Das bedeutet aber, daß die Empfindlichkeit

des Atemzentrums gegen CO_2 herabgesetzt sein muß. Beim Wärmehecheln würde es sich demnach um einen Zustand mit physiologisch heraufgesetzter CO_2-Schwelle handeln, wie es sonst nur unter pathophysiologischen Bedingungen bekannt ist.

Regeltechnisch gesehen handelt es sich um zwei Regelkreise, die über ein gemeinsames Stellglied — die Atmung — miteinander vermascht sind. Bei starker Beanspruchung des einen Regelkreises (für die Wärmeregulierung) wird in dem anderen Regelkreis (für die Regulierung des Gaswechsels) der Sollwert der Regelgröße „CO_2-Spannung" verstellt, so daß die Hilfsregelgröße „O_2-Spannung" die Führung übernimmt.

Literatur

Albers, C., u. W. Brendel: Pflügers Arch. **260**, 345 (1955). — Åström, A.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **27**, Suppl. 98 (1952). — Lamy, P., et P. Arnould: C. r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 142 (1954). — Opitz, E.: Erg. Physiol. **44**, 315 (1941). — Schröder, W.: Arch. Kreislaufforsch. **15**, 24 (1949).

C. Albers, W. Brendel und W. Usinger (Bad Nauheim-Gießen): **Die Regulierung des Blutdrucks in Barbitursäure- und Äthernarkose**

Unter den biologischen Regelungsvorgängen eignen sich besonders jene zur feineren Analyse, deren Regelgröße fortlaufend registriert werden kann und die damit womöglich einer quantitativen mathematischen Behandlung zugänglich gemacht werden können. Für die Untersuchung der Blutdruckregelung bietet die unblutige Blutdruckschreibung am Carotisschlingenhund sehr günstige Möglichkeiten, zumal das Verfahren am unnarkotisierten Tier angewandt werden kann. Sehr aufschlußreich ist für die regeltechnische Betrachtung das Verhalten des Blutdrucks bei einseitiger Abklemmung einer Carotis; dabei stellt sich der Blutdruck meist rasch auf ein höheres konstantes Niveau ein. Löst man nach einiger Zeit die Abklemmung, entsteht eine erneute Störung im System, das daraufhin rasch in die Ausgangslage zurückschwingt. Die Störung erfüllt dabei beide Voraussetzungen, um den Einschwingvorgang formal als Übergangsfunktion beschreiben zu können (Drischel): sie ist stoßförmig und von nur geringer Größe.

Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt die Einwirkung der Barbiturat- und der Äthernarkose, so lassen sich 3 Typen unterscheiden: 1. Der *Normaltyp*. Sowohl bei der Abklemmung als auch beim Lösen stellt sich der Blutdruck rasch auf den Endwert ein, die Blutdruckkurve ähnelt einem Trapez mit steilen Flanken. 2. Der *Barbiturattyp*. Während leichter Barbitursäurenarkose schnellt der Blutdruck nach Carotisabklemmung rasch auf das höhere Niveau, nach Freigeben der Carotis

kommt es zu einer überschießenden Reaktion, der Blutdruck schwingt unter die Ausgangslage und kehrt dann in diese zurück. 3. Der *Äthertyp.* Bei leichter Äthernarkose reagiert der Blutdruck nur sehr träge sowohl auf die Abklemmung als auf die Freigabe, so daß die Blutdruckkurve einem flachen, stumpfwinkligen Dreieck ähnelt.

Faßt man den Blutdruckregelkreis als ein System 2. Ordnung auf (Wagner; Drischel), so würde der Normaltyp dem aperiodischen Grenzfall, der Barbiturattyp der „periodischen Entartung" und der Äthertyp der „aperiodischen Entartung" (Drischel) entsprechen. Die Verschiedenartigkeit der Kreislaufbilder in Barbiturat- und in Äthernarkose wäre demnach durch gegensinnige Einwirkung auf das sogenannte Dämpfungsverhältnis des Regelkreises zurückzuführen. Diese Auffassung stützt die von Koppermann, Brendel u. Thauer sowie Albers, Brendel u. Usinger entwickelte Anschauung, wonach bei beiden Narkosearten die Kreislaufumstellung durch Beeinflussung der reflektorischen Selbststeuerung im Sinne einer Entzügelung zu erklären ist.

Literatur

Albers, C., W. Brendel u. W. Usinger: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 278 (1955). — Drischel, H.: Wissenschaft. Z. d. Univ. Greifswald II, Nr. 2 1952/53. — Koppermann, E., W. Brendel u. R. Thauer: Pflügers Arch. **260**, 239 (1955). — Wagner, R.: Probleme und Beispiele biologischer Regelung. Stuttgart: Thieme, 1954.

F. W. Behmann (Bad Nauheim): Die Regulierung der Wärmeproduktion bei Auskühlung homoiothermer Tiere

Das funktionelle Verhalten der gegenregulativen Wärmeproduktion bei Hypothermie wird durch den gegensinnigen Einfluß der Temperaturregulation und der Arrheniusschen Gleichung bestimmt. Zur Klärung dieser Zusammenhänge wurden die folgenden Untersuchungen an intravasal gekühlten Hunden[1] unter konstanten äußeren Klimabedingungen durchgeführt.

Trägt man die bei zeitlich konstanter Rectaltemperatur gemessene Wärmeproduktion als Funktion der Auskühlung auf, so findet man: a) bei fehlender Gegenregulation einen stetigen Abfall und b) bei starker Gegenregulation einen Kurvenverlauf mit steilem Anstieg und deutlichem Maximum, welcher dem Verlauf einer bei etwa 31° C abgebrochenen aperiodisch gedämpften Schwingung ähnlich ist.

Beschränkt man die Betrachtungen auf Körpertemperaturen oberhalb 31° C, so läßt sich die bei flacher Narkose beobachtete Maximum-

[1] Methode: F. W. Behmann u. E. Bontke: Pflügers Arch., im Druck.

kurve der Wärmeproduktion durch eine Überlagerung von zwei Exponentialfunktionen deuten. Von diesen dürfte die eine Funktion der ARRHENIUSschen Gleichung, die andere der narkoseabhängigen Gegenregulation zuzuordnen sein. Da jedoch der Anteil der gegenregulativen Wärmebildung meßtechnisch nicht allein erfaßt werden kann, sind weitere Aussagen auf Grund der experimentellen Befunde zunächst nicht möglich.

Um die Beeinflussung der Wärmeproduktion durch die Narkosetiefe quantitativ kennzeichnen zu können, sei angenommen, daß zur Erfüllung einer vorgegebenen Regelaufgabe die Temperaturregulation die Produktion einer bestimmten Wärmemenge p' vom Organismus anfordere, dagegen in Wirklichkeit nur eine Wärmemenge $p - np'$ vom Organismus zur Verfügung gestellt wird. Das Tier möge nun bei einer Körpertemperatur $\vartheta = 37 - t_{(°C)}$ insgesamt eine auf die Körperoberfläche reduzierte Wärmemenge $p(\vartheta)$ produzieren. Wird jetzt die Auskühlung um den kleinen Betrag $d\vartheta$ vergrößert, so wird die Wärmebildung bei $\vartheta + d\vartheta$ die Größe $p(\vartheta + d\vartheta) - p(\vartheta) + (dp/d\vartheta)d\vartheta$ aufweisen, wobei die zusätzliche Produktion der kleinen Wärmemenge $dp - (dp/d\vartheta)d\vartheta$ durch die Temperaturregulation veranlaßt werde. Die tatsächlich zur Verfügung stehende Wärmeproduktion ist aber eine Funktion der zusätzlich angeforderten Wärmeproduktion, so daß $dp = (dp'/d\vartheta)(n \cdot d\vartheta) = \varepsilon(dp'/d\vartheta)$. Das Produkt $n \cdot d\vartheta = \varepsilon$ definiert also für $d\vartheta = 1$ das Verhältnis von produzierter zu angeforderter Wärme. Für die gesamte Wärmeproduktion $p(\vartheta) + dp$ muß ferner die ARRHENIUSsche Gleichung erfüllt sein:

$$p + \varepsilon \frac{dp'}{d\vartheta} = C\,\mathrm{e}^{-\frac{\mu}{RT}} \tag{1}$$

Soll sich nun das um $d\vartheta$ ausgekühlte Tier auf Grund einer gesteigerten Wärmeproduktion innerhalb der Zeit τ auf seinen Ausgangswert ϑ wiedererwärmen, d. h. soll die Auskühlung um $(-d\vartheta)$ vermindert werden, so muß die Temperaturregulation die Produktion einer Wärmemenge $(-Gcd\vartheta/\tau F)$ anfordern. Da sich bei der Wiedererwärmung um $(-d\vartheta)$ auch die Hauttemperatur um $(-d\vartheta_H)$ ändert, werden die äußeren Wärmeverluste anwachsen. Um diese zu decken, muß von der Temperaturregulation außerdem die Produktion einer Wärmemenge $(-\alpha\, d\vartheta_H)$ vom Organismus angefordert werden. Berücksichtigt man, daß im stationären Zustand angenähert $d\vartheta_H = -(1/\alpha)dp$ ist, so läßt sich Gl. (1) in der Form darstellen:

$$\frac{dp}{d\vartheta} + \frac{1}{\varepsilon}\,p = \frac{1}{\varepsilon}\,C\,\mathrm{e}^{-\frac{\mu}{RT_0}\left(1+\frac{\vartheta}{T_0}\right)} + \frac{Gc}{\tau F}. \tag{2}$$

Das Integral dieser Differentialgleichung kann durch folgenden Ausdruck wiedergegeben werden:

$$p = \frac{p_{\mathrm{Min}}}{1 - \frac{\mu}{RT_0}\left(\frac{\varepsilon}{T_0}\right)}\,\mathrm{e}^{-\frac{\mu}{RT_0}\left(\frac{\vartheta}{T_0}\right)} + \varepsilon\,\frac{Gc}{\tau F}\left(1 - \mathrm{e}^{-\frac{\vartheta}{\varepsilon}}\right). \tag{3}$$

Diese Gleichung zeigt dasselbe Funktionsverhalten wie der empirische Kurvenverlauf bei starker Gegenregulation und geht für $\varepsilon = 0$ stetig in den Kurvenverlauf $p = p_{\mathrm{Min}} \exp(-\mu\vartheta/RT_0^2)$ bei fehlender Gegenregulation über. p_{Min} definiert die Wärmebildung des Minimalumsatzes.

Auf Grund einer Diskussion der Gl. (3) folgt:

1. Die Gesamtwärmebildung des Organismus ist die Summe von der mit zunehmender Auskühlung exponentiell *abfallenden* Grundwärmeproduktion und der exponentiell *anwachsenden* gegenregulativen Wärmebildung.

2. Die Grundwärmeproduktion nimmt bei abnehmender Empfindlichkeit des Regelsystems ($\varepsilon \to 0$) hyperbolisch ab.

3. Die gegenregulative Wärmebildung ist auf den mit der Empfindlichkeit ε anwachsenden Maximalwert $\varepsilon(Gc/\tau F)$ begrenzt.

4. Je nach der narkoseabhängigen Empfindlichkeit des Regelsystems verläuft die Kurve der Gesamtwärmebildung entweder steil ansteigend mit hohem Maximum, flacher ansteigend mit niedrigerem Maximum oder von vornherein stetig abfallend.

5. Diese verschiedenartigen Kurvenverläufe stehen nicht im Widerspruch zu der Arrheniusschen Gleichung.

6. Die Annahme einer veränderten Aktivierungsenergie während der Gegenregulation ist nicht erforderlich.

7. Der Kurvenverlauf der Gesamtwärmebildung ist nur bei Annahme einer peripheren und einer zentralen Beeinflussung des Regelsystems erklärbar.

8. Die Annahme verschiedenartiger Receptoren in der Peripherie ist zur Erklärung des beobachteten Kurvenverlaufes nicht erforderlich.

E. Gerlach (Heidelberg): Einfluß von Stoffwechselgiften auf die Phosphorsäure-Ester und den $^{32}PO_4$-Turnover in Menschen- und Tauben-Erythrocyten

Zur weiteren Klärung der Zusammenhänge zwischen aktivem Kationentransport und dem Stoffwechsel energiereicher Phosphorsäure-Ester wurde der Einfluß bestimmter Stoffwechselgifte (2,4-Dinitrophenol, NaCN, Monojodessigsäure) auf die Konzentration und den $^{32}PO_4$-Austausch der in Menschen- und Tauben-Erythrocyten vorkommenden Phosphor-Verbindungen untersucht. Diese Gifte können nach Ergebnissen von Maizels und anderen die aktiven Kationenbewegungen in Erythrocyten hemmen.

Alle Versuche wurden mit gewaschenen, in Phosphat-haltiger Locke-Lösung (3,8 mg% PO_4) bei 37° C inkubierten Erythrocyten durchgeführt. Inhibitoren und $^{32}PO_4$ wurden dieser Lösung zugesetzt. Die Trennung der P-Verbindungen erfolgte mittels papierchromatographischer Arbeitsweise (Fleckenstein u. Gerlach), die durch mehrdimensionale Anwendung neuer Lösungsmittel (Gerlach, Weber, Döring) verfeinert werden

konnte. Der quantitativen Auswertung dienten Phosphoranalysen der getrennten Verbindungen und Messung ihrer spezifischen Aktivitäten im Flüssigkeitszählrohr. Außerdem wurden die spezifischen Aktivitäten der einzelnen P-Atome von ATP (α-P, β-P, γ-P) getrennt bestimmt.

Vergiftung von Tauben-Erythrocyten mit 2,4-Dinitrophenol (DNP) oder NaCN (Endkonzentration 5×10^{-4} Mol, Einwirkungsdauer 25 min) führt zu einem 80—85%igen Zerfall von ATP und einer in gleicher Größenordnung liegenden Hemmung des $^{32}PO_4$-Einbaus in alle P-Fraktionen sowie in die α, β- und γ-Position des verbliebenen ATP. AMP und ADP nehmen während der Vergiftung als Folge des ATP-Abbaues nur geringfügig zu, da durch die Anwesenheit einer sehr aktiven Desaminase eine erhebliche Neubildung von IMP (= Inosinmonophosphat) zu beobachten ist. Zwei noch unbekannte Nucleotide (XTP und XDP), die sich wie Tri- und Diphosphate eines Nucleosids verhalten, zeigen ähnliche Konzentrationsveränderungen wie ATP und ADP. Phytinsäure als größte Phosphor-Fraktion des Tauben-Erythrocyten bleibt bei DNP- oder NaCN-Vergiftung konzentrationsmäßig unverändert erhalten.

Ohne nachweisbare Wirkung auf die P-Ester und den $^{32}PO_4^{2}$-Austausch ist die Vergiftung von Tauben-Erythrocyten mit Monojodessigsäure (Endkonzentration 5×10^{-4} Mol, Einwirkungsdauer 45 min). Dagegen wird unter denselben Bedingungen in menschlichen Erythrocyten der Gehalt an ATP sowie die Austauschgeschwindigkeit des α-, β- und γ-P von ATP um 90% reduziert. Als Folge des ATP-Zerfalls kommt es hier zur Anreicherung von AMP ohne sichtbare Neubildung von IMP. 2,3-Diphosphoglycerinsäure bleibt während der Monojodessigsäure-Vergiftung in ihrer Konzentration erhalten, doch ist der Einbau von $^{32}PO_4$ in diese Fraktion vollständig blockiert. Erwartungsgemäß ist eine Konzentrationszunahme von Orthophosphat sowie von Hexosediphosphat und Triosephosphat zu beobachten. Der $^{32}PO_4$-Austausch dieser Verbindungen ist nur mäßig reduziert. DNP oder NaCN — in den am Tauben-Erythrocyten stark wirksamen Konzentrationen — beeinflussen den Phosphorsäure-Stoffwechsel in menschlichen Erythrocyten praktisch nicht.

Es ergibt sich somit, daß 2,4-Dinitrophenol und Cyanid als Inhibitoren der Atmungskettenphosphorylierung nur an atmenden Tauben-Erythrocyten, nicht jedoch an glykolysierenden Menschen-Erythrocyten wirksam sind. Dementsprechend hemmen diese beiden Stoffe nur in Tauben-Erythrocyten den aktiven Kationentransport. Monojodessigsäure kann dagegen nur in glykolysierenden Menschen-Erythrocyten die Bildung von energiereichem Phosphat (durch Hemmung der Substratphosphorylierung) unterdrücken und blockiert in Übereinstimmung damit hier auch die aktiven Kationenbewegungen. In beiden Erythrocytenarten wird also die Kalium-Stapelung und die Natrium-Elimination

durch solche Gifte aufgehoben, welche die Resynthese von energiereichem Phosphat, speziell von ATP, verhindern. Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen von Straub sowie Gardos überein, nach denen Adenosintriphosphat in Erythrocyten der Betriebsstoff der „Kaliumpumpe" zu sein scheint.

Literatur

Fleckenstein, A., u. E. Gerlach: Papierchromatographische Trennung von Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat und anderen Phosphorverbindungen bei Säugetier- und Taubenerythrocyten verschiedenen K^+-Gehalts. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 531 (1953). — Gardos, G.: Akkumulation der Kalium-Ionen durch menschliche Blutkörperchen. Acta Physiol. Acad. Sci. Hungaricae **6**, 191 (1954). — Gerlach, E., E. Weber u. H.-J. Döring: Einige neue Lösungsmittel für die Papierchromatographie von Phosphorsäure-Estern. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 9 (1955). — Maizels, M.: Cation transport in chicken erythrocytes. J. of Physiol. **125**, 263 (1954). — Straub, F. B.: Über die Akkumulation der Kalium-Ionen durch menschliche Blutkörperchen. Acta Physiol. Acad. Sci. Hungaricae **4**, 235 (1953).

F. Lembeck und R. Strobach (Graz): Kaliumabgabe aus glatter Muskulatur

Im Vergleich zu den umfangreichen Befunden an der quergestreiften Muskulatur ist über die $K^{\cdot}$-Abgabe beim glatten Muskel nur wenig bekannt.

Etwa 2 cm lange Stücke des Katzendünndarmes wurden oben und unten zugebunden und in 10 ml $K^{\cdot}$-freier Tyrodelösung aufgehängt. Die Versuche wurden bei 25° C durchgeführt, da bei dieser Temperatur keine Spontanrhythmik mehr auftrat. Als Kontrollen dienten angrenzende Darmstücke in Parallelgefäßen. Alle 10 min wurde der Kaliumgehalt in der Badeflüssigkeit flammenphotometrisch bestimmt.

1. Verlauf der Kaliumabgabe innerhalb von 6 mal 10 min

Je nach Versuchsbedingung kam es zu einem verschieden raschen exponentiellen Abfall der $K^{\cdot}$-Abgabe.

a) Bei Stickstoffbelüftung des Bades war die $K^{\cdot}$-Abgabe kaum größer als unter Sauerstoff.

b) Eine deutliche Erhöhung der $K^{\cdot}$-Abgabe zeigte sich jedoch nach Glykolysehemmung mittels NaF.

c) Je niedriger die Temperatur, um so rascher verliert der Darm sein Kalium.

d) Bei niedrigem p_H (6,4 im Vergleich zu 7,6) ist die Tendenz zur $K^{\cdot}$-Abgabe vermindert.

e) Bei Fehlen von $Ca^{\cdot\cdot}$ in der Badeflüssigkeit ist die $K^{\cdot}$-Abgabe erhöht, bei erhöhtem $Ca^{\cdot\cdot}$-Gehalt vermindert.

Diese Befunde entsprechen somit den Ergebnissen am quergestreiften Muskel.

2. Pharmakaeinfluß

a) Setzt man dem Bad nach drei 10 min-Intervallen mit der nächsten Füllung K^+-freier Tyrode Acetylcholin zu, so kommt es regelmäßig zur Kontraktion und zu einer deutlichen Erhöhung der K^+-Abgabe. Durch vorherigen oder gleichzeitigen Atropin- bzw. Papaverinzusatz wurden Kontraktion und K^+-Abgabe verhindert. Cocain und Hexamethonium waren ohne Einfluß auf die Acetylcholin-Wirkung.

b) Auch andere Pharmaka, die zur Kontraktion führten (Prostigmin, Tetramethylammonium), lösten eine erhöhte K^+-Abgabe aus. Pilocarpin, Nicotin, Succinylcholin und Decamethonium führten nur unregelmäßig zu einer Kontraktion und erhöhten K^+-Abgabe. Histamin, welches den Katzendarm nicht kontrahiert, blieb auch ohne Einfluß auf die K^+-Abgabe.

3. Dehnung des Darmstückes blieb ohne Einfluß auf die K^+-Abgabe.

Kontraktion des glatten Muskels ist regelmäßig mit einer Erhöhung der K^+-Abgabe verbunden. Daraus kann angenommen werden, daß dem K^+-Austausch beim glatten Muskel ähnliche Bedeutung wie beim quergestreiften Muskel zukommt.

O. Kraupp, W. Kobinger, H. Stormann und H. P. Clodi (Wien): Kaliumfreisetzung sowie Natrium- und Chlorionenverschiebungen aus der Skeletmuskulatur durch Acetylcholin bei Durchströmung mit natriumarmer Blut-Tyrode-Verdünnung

In Ergänzung der Versuche über die Kaliumfreisetzung aus der Skeletmuskulatur durch ACh[2] wurde der Einfluß einer Erniedrigung der Natrium- und Chlorionenkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit von 140 auf rund 20 mÄ/l auf die Kaliumabgabe hinterer Extremitäten von Katzen nach intraarteriellen Einzelinjektionen von ACh untersucht. Zur Aufrechterhaltung des normalen osmotischen Druckes wurden 200—210 mM/l Saccharose zugesetzt. Durch die Erniedrigung des Natrium- und Chlorionengehaltes der Durchströmungsflüssigkeit war es außerdem möglich, Änderungen der Natrium- und Chlorionenkonzentrationen nach der ACh-Injektion in der ausströmenden Flüssigkeit analytisch zu erfassen.

In 10 Durchströmungsversuchen konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

1. Innerhalb von 2—3 min nach der Umschaltung von normaler Blut-Tyrode-Lösung auf die natriumarme Durchströmungsflüssigkeit setzte ein steiler Anstieg der Kaliumkonzentration in der ausströmenden Flüssigkeit ein, wobei die VA-Differenz (vor der Umschaltung praktisch gleich 0) innerhalb weniger Minuten einen maximalen Wert von rund 2,0 mÄ/l erreichte und für die Versuchsdauer bis zu 1½ Std konstant beibehielt. Unter Berücksichtigung der Durchflußmengen (10—15 ml/min/Extr.), betrug die hierbei beobachtete Kaliumabgabe aus der Muskulatur rund 20 μM/min/Extr., wobei kein wesentlicher Unterschied im Verhalten normal innervierter und chronisch denervierter Extremitäten

(Denervationszeit 8—14 Tage) festzustellen war. Diese durch die Herabsetzung der Natriumchloridkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit bedingte Kaliumausschüttung konnte durch Zusatz von d-Tubocurarin (10^{-5} Mol/l in der Durchströmungsflüssigkeit) nicht beeinflußt werden.

2. Nach intraarterieller Verabreichung von ACh bei Durchströmung mit natriumarmer Durchströmungsflüssigkeit trat an der innervierten Muskulatur erst in einem Dosenbereich von 4—30 μM ACh eine deutlich nachweisbare dosisabhängige Erhöhung der in 1. beschriebenen Kaliumabgabe der Muskulatur auf (5—20 μM). An der denervierten Extremität führten bereits 0,05 μM ACh zu einer zusätzlichen Erhöhung der Kaliumfreisetzung, die in einem Dosenbereich von 0,05—40 μM ACh dosisabhängig 5 bis etwa 100 μM Kalium betrug. An beiden Extremitäten war die Größe der Kaliumfreisetzung gegenüber analogen Versuchen[2] mit normaler Durchströmungsflüssigkeit bedeutend herabgesetzt. Zusatz von d-Tubocurarin zur Durchströmungsflüssigkeit (10^{-5} M/l) verhinderte an beiden Extremitäten die auf ACh zusätzlich erfolgende Kaliumfreisetzung.

3. Nach der Umschaltung auf die natriumarme Durchströmungsflüssigkeit sank die Natriumkonzentration in der ausströmenden Flüssigkeit rasch ab und erreichte innerhalb 30—40 min ein weitgehend konstantes Niveau, wobei sich die VA-Differenz an beiden Extremitäten meist auf einen Wert von +2—3 mÄ/l (im Sinne einer Natriumabgabe aus der Muskulatur) einstellte. Nach Einstellen dieser konstanten Natriumabgabe führte die intraarterielle Verabreichung von ACh in Dosen von 0,05—40 μM an beiden Extremitäten zu einer deutlichen vorübergehenden Herabsetzung der Natriumkonzentration in der ausströmenden Flüssigkeit und damit zu einem Eintritt von Natriumionen in die Muskulatur. Dieser Natriumeintritt lag bei Dosen von 1,0—40 μM ACh an innervierter und denervierter Extremität in der gleichen Größenordnung (50—150 μM Natrium). d-Tubocurarin in einer Konzentration von 10^{-5} M/l in der Durchströmungsflüssigkeit brachte den Natriumeintritt nach ACh an beiden Extremitäten zum Verschwinden.

4. Bei den Chloridionen stellte sich ebenfalls wie bei Natrium 30—40 min nach der Umschaltung auf die natriumchloridarme Durchströmungsflüssigkeit eine annähernd konstante positive VA-Differenz von rund 2 mÄ/l ein. Nach intraarterieller Verabreichung von ACh in den oben angegebenen Dosen konnte an beiden Extremitäten in der Regel ein Eintritt von Chloridionen in die Muskulatur beobachtet werden, der jedoch in allen Fällen bedeutend geringer als der des Natriums war.

In einigen Kontrollversuchen waren die Extremitäten vor dem Versuch enthäutet worden, was jedoch keine Änderung des Ausfalls der Versuche bewirkte.

Die Tatsache, daß bei Herabsetzung der Natriumkonzentration in der Extracellulärflüssigkeit die durch ACh bewirkte Kaliumfreisetzumg aus der Muskulatur stark herabgesetzt wird, steht in Übereinstimmung mit den Befunden von Nastuk[3, 4] und Del Castillo u. Katz[1], wonach die durch ACh bewirkte Depolarisation isolierter Endplatten in natriumarmem bzw. natriumfreiem Ringer weitgehend verhindert wird. Der Befund, daß besonders an der innervierten Muskulatur in einem Dosenbereich von 0,1—1,0 μM ACh wohl ein deutlicher Natriumeintritt jedoch kein meßbarer Kaliumaustritt erfolgt, spricht für einen aktiven Mechanismus des Natriumeintrittes durch ACh, wie er besonders von Nastuk[3] angenommen wird. Damit in Übereinstimmung steht die Tatsache, daß an beiden Extremitäten auch bei den höheren ACh-Dosen stets mehr Natrium ein- als Kalium austritt, obwohl unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen der Gradient zwischen intra- und extracellulärer Kaliumkonzentration (rund 0,1 M/l) ungefähr 10fach höher war als der entgegengesetzt gerichtete Gradient des Natriums (rund 0,01 M/l).

Literatur

[1] Del Castillo, J., and B. Katz: J. of Physiol. **128**, 396 (1955). — [2] Kraupp, O., G. Werner, W. Kobinger u. H. Stormann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 301 (1955). — [3] Nastuk, W. S.,: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **42**, 249 (1953). — [4] Nastuk, W. S.: Federat. Proc. **13**, 104 (1954).

M. Reiter (München): Wirkung kontraktionsverbessernder Maßnahmen auf den Alkaligehalt des isolierten Herzmuskels

In Ringer-Lösung inkubierte Rattenherzstreifen haben einen höheren Alkaligehalt als zur Zeit der Präparation[1]. Nach Steigerung der Reizfrequenz von 1/sec auf 10/sec, wie nach Verminderung der Natriumkonzentration der Suspensionslösung erfolgt eine Abnahme des Alkaligehalts des Muskels auf Werte, die dem in vivo angenähert sind. Die Kontraktionskraft nimmt dabei um mehr als 100% zu, nach Natriumentzug für lange Zeit, bei hoher Reizfrequenz vorübergehend nach Zurückschalten auf niedrige Reizfrequenz.

g-Strophanthin in inotrop wirksamer Konzentration verursacht keine Verminderung der erhöhten Summe Na + K. Es hemmt in gleicher Weise den Kaliumaustritt und die Kaliumrückresorption. In kontrakturerzeugender Konzentration bewirkt g-Strophanthin parallel zur Entwicklung der Kontraktur eine Abnahme der intracellulären Kalium- und eine Zunahme der Natriumkonzentration.

[1] Reiter, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 138 (1955).

Diskussion. Wollenberger (Humboldt-Univ., Berlin): Hajder hat betont, daß nicht die Konzentrationen von Na^+ und K^+ in der Herzmuskelfaser bzw. ihre Summe, sondern der absolute intracelluläre Gehalt an diesen Kationen in Beziehung zur entwickelten Spannung stehen. Es müssen also das Volumen der Muskelfaser oder Volumenveränderungen berücksichtigt werden.

v. Brücke (Wien): Welche Veränderungen traten in der Relation von Na zu Ca ein?

Rummel (Düsseldorf): Es besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Ca-Na-Relation bei der beobachteten Verstärkung der Kontraktion eine Rolle spielt, da man am Rattenzwerchfell eine Hyperpolarisation und verstärkte Kontraktionen bei erhöhter Ca-Konzentration festgestellt hat (eigene Beobachtungen).

Lüllmann (Mainz): Die Verhältnisse am Skeletmuskel der Ratte müssen andere sein als am Herzmuskel. In Versuchen am Zwerchfell trat eine Steigerung der Kontraktionshöhe nach Verminderung der Na^+ nur dann ein, wenn die Hypotonie der Lösung nicht durch einen Zusatz von Saccharose ausgeglichen wurde.

Schlußwort. Reiter: Hinsichtlich einer etwaigen Beeinflussung des Membranruhepotentials durch die Änderung des Natriumgradienten bei gleichbleibender Calciumkonzentration verweise ich auf die Arbeiten von Draper u. Weidmann[1] und von Desmedt[2], die diese Frage am Warmblüterherzmuskel bzw. am Froschmuskel untersucht haben. Beide fanden übereinstimmend, daß mit Verminderung des Natriumgradienten bei gleicher Calciumkonzentration das Aktionspotential zwar abnimmt, das Membranruhepotential sich aber nicht ändert.

Die Abnahme der Gesamtalkalikonzentration des Muskels nach Verminderung der Natriumkonzentration in der Außenlösung ist auch mit einer Verringerung der Gesamtalkalimenge verbunden, sie beruht nicht auf einer Veränderung des Wassergehaltes.

Der von Lüllmann u. Muscholl[3] am Zwerchfellmuskel beobachtete inotrope Effekt einfach verdünnter, hypotoner Salzlösung läßt sich am Herzmuskel nicht nachweisen.

A. Wollenberger und B. Wahler (Berlin): Einfluß von Protoveratrin und Strophanthin auf den Kationen- und Phosphatgehalt von Gehirnrindegewebe

In der ersten Versuchsreihe dieser Untersuchung wurden Schnitte der Großhirnrinde erwachsener Meerschweinchen mit der Schneidevorrichtung von McIlwain angefertigt, gewogen und zunächst für 10 min mit 50 ml (pro 100 mg Gewebe) einer Kalium- und substratfreien Ringer-Lösung unter O_2-Zufuhr gewaschen. Dies führte zum Verlust von 80 bis 90% der ursprünglich im Gewebe enthaltenen Kaliumionen. Diese wurden flammenphotometrisch im veraschten Gewebe bestimmt. Die

[1] J. of Physiol. **115**, 74 (1951).
[2] J. of Physiol. **121**, 191 (1953).
[3] Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **221**, 209 (1954).

gewaschenen Schnitte wurden in Seitenarme von Inkubationsgefäßen übergeführt, die im Hauptraum glutaminat- und glucosehaltige Ringer-Lösung enthielten, und nach Sättigung der Lösung mit O_2 oder einem O_2-CO_2-Gemisch eingekippt. Wie Terner, Eggleston u. Krebs[2] gezeigt haben, wird durch Zusatz von Glutaminat zur Inkubationsflüssigkeit von Gehirnrindeschnitten die Kaliumaufnahme beschleunigt. In den vorliegenden Versuchen stieg der K^+-Gehalt des Gewebes innerhalb von 45 min normalerweise von durchschnittlich 14 auf 60 Mikro-Äqu./g an. Protoveratrin und Strophanthin in Konzentrationen von 2,75 bzw. 5 Mikromol/l hemmten die Kaliumakkumulation. Bei Protoveratrin betrug die Hemmung etwa 80%, bei Strophanthin 100%. In einigen Versuchen wurde auch die Sauerstoffaufnahme des Gewebes gemessen, jedoch keine Beeinträchtigung durch Protoveratrin oder Strophanthin festgestellt.

In der nächsten Versuchsreihe wurden Gehirnrindeschnitte in glutaminsäurehaltiger Lösung vorinkubiert, so daß sie zu Beginn des eigentlichen Versuchs einen für in vitro-Gewebe verhältnismäßig hohen K^+- und niedrigen Na^+-Gehalt aufwiesen. Zum Zeitpunkt des Zusatzes von Protoveratrin und Strophanthin in den obengenannten Endkonzentrationen betrug die intracelluläre Konzentration, die unter Berücksichtigung des Wassergehaltes und des Inulinraumes der Schnitte unmittelbar vor der Analyse errechnet wurde, 158 Mikro-Äqu. K^+ und 68 Mikro-Äqu. Na^+ pro Gramm Zellwasser. 40minutige Behandlung mit Strophanthin führte trotz Gegenwart von Glutaminsäure zu 70%igem Verlust an intracellulärem Kalium und zur Verdoppelung des intracellulären Natriumgehaltes. 60minutige Behandlung mit Protoveratrin, welches die Atmungsgeschwindigkeit (ohne Glutaminat) steigerte, bewirkte ein Absinken des intracellulären Kaliumgehalts um 30% und ein entsprechendes Eindringen von Natrium in die Zellen.

Diese Ergebnisse stimmen im großen und ganzen mit Befunden überein, die von anderen Autoren am Herz- und Skeletmuskel, an der Nervenfaser und an Erythrocyten erhoben worden sind.

In einer weiteren Versuchsserie wurden Großhirnrindeschnitte, die in „Tris"-Ringer-Lösung mit 3,3 Mikro-mol Protoveratrin oder 5 Mikro-mol Strophanthin behandelt worden waren, auf ihren Gehalt an einigen säurelöslichen Phosphaten analysiert. Für die Phosphatanalyse wurde die Methode von Martin u. Doty[1] so weiterentwickelt, daß das freie Orthophosphat bei 0° innerhalb weniger Sekunden nach Bildung des Phosphomolybdatkomplexes durch Überführung in Isopropylacetat abgetrennt werden konnte. Phosphokreatin wurde mittels der Barrit-Reaktion als gebundenes Kreatin bestimmt. Wie spezifische Phosphokreatinbestimmungen an der Anionenaustauschsäule (Dowex 1) ergaben,

spiegeln die Werte für gebundenes Kreatin die tatsächlichen Phosphokreatinwerte gut wieder. Dagegen lagen die Werte für gebundenes Kreatin um durchschnittlich 30% niedriger als die Werte für säurelabiles Phosphat. Die sogenannte labile Phosphatfraktion enthält daher in sauren Extrakten der Gehirnrinde außer Phosphokreatin noch eine andere Phosphatverbindung. Diese Verbindung ist in saurer Molybdatlösung erheblich unbeständiger als Phosphokreatin.

Protoveratrin und Strophanthin verursachten während 20- bis 80minutiger Inkubation bei erhöhtem O_2-Verbrauch eine 20—45%ige Verminderung des Phosphokreatingehalts gegenüber den Kontrollwerten. Das anorganische Phosphat war entsprechend vermehrt. Der Gehalt an Phosphat, das durch 10minutiges Kochen in 1 N/Salzsäure abgespalten werden konnte, war nicht wesentlich verändert.

Folgender Zusammenhang zwischen den hier gezeigten Wirkungen des Protoveratrins und Strophanthins und der früher beschriebenen Stimulierung der Glykolyse und Atmung der Gehirnrinde durch diese Pharmaka[3, 4] ist nicht unwahrscheinlich: Die primär auftretende Stoffwechselveränderung ist die Anreicherung an Na^+ oder der damit zusammenhängende Verlust von K^+. Dies könnte auf Schädigung des aktiven, energieverbrauchenden Transportmechanismus beruhen, der zur Wiederherstellung und Aufrechterhaltung normaler Kationenkonzentrationsgradienten zwischen Zellinnerem und Außenflüssigkeit dient. Der gestörte Transportmechanismus verschleißt zusätzliche Energie, und diese wird geliefert durch vermehrten Abbau von energiereichem Phosphat. Die sich daraus ergebende Erhöhung des Gehalts an anorganischem Phosphat und Phosphatacceptoren gibt den Anstoß zu beschleunigter Glykolyse und Atmung.

Literatur

[1] Martin, J. B., and D. M. Doty: Analyt. Chemistry **21**, 965 (1949). — [2] Terner, C., L. V. Eggleston and H. A. Krebs: Biochemic. J. **47**, 139 (1950). — [3] Wollenberger, A.: Federat. Proc. **9**, 326 (1950). — [4] Wollenberger, A.: Biochemic. J. **61**, 68 (1955).

G. Malorny (Kiel): Mineralverschiebungen und Gewebsgasänderungen bei verschiedenen Kollapszuständen und ihre Beeinflußbarkeit durch Antihistaminica

Im Kollaps kommt es infolge Kreislaufversagens zu einer Verschlechterung der Gewebeventilation. Sie ist charakterisiert durch eine Hypoxie, die von einer Kohlensäurerückstauung begleitet ist. Das Verhalten der differenten Gewebsgase CO_2 und O_2 wurde am Pneumoperitoneum des

Kaninchens geprüft. Als Gasanalysengerät diente der Mikrogasanalysator nach SCHOLANDER (1947).

Nach intravenöser Histamingabe von 1,1 mg/kg im Mittel steigt die CO_2-Spannung von 46,7 auf 59,2 mm Hg an, während die O_2-Spannung von 38,1 auf 26,8 mm Hg absinkt. Die Änderungen sind statistisch gesichert. Zur Prüfung der Frage, inwieweit durch die vorherige Gabe von Antihistaminsubstanzen die tödliche Histaminwirkung bekämpft werden kann (siehe auch HAAS, 1952), haben wir ein Schema der Histaminapplikation entwickelt, das eine Gewöhnung verhindert. In Abständen von 15—30 min werden steigende Histamindosen i.v. verabfolgt, angefangen mit 0,3 mg/kg und zunächst jeweils nur um 0,1 mg/kg steigend, später mit verkürzten Zeitintervallen und verdoppelten Dosen. In Kontrollversuchen tritt der Tod nach der 3.—5. Injektion unter den Erscheinungen eines Kollapses mit Lungensperre ein. Injiziert man einem Kaninchen vorher 5 mg/kg N-(2′-Trimethylammonium-2′-methyläthyl)-phenothiazin-hydroxyd („Padisal", W.Z.), so verträgt das Tier die 60—100fache Histaminmenge intravenös. Am Ende eines solchen Versuchs ist pCO_2 nicht erhöht, pO_2 aber wegen der vasoplegischen Wirkung des Padisal deutlich abgesunken. Oft scheinen die Tiere sich in einem Präkollaps zu befinden, der aber überwunden wird. „Atosil" (W.Z.) ist etwa halb so wirksam wie Padisal. Noch geringer ist die Schutzwirkung des „Megaphen" (W.Z.).

Im orthostatischen Kollaps sind die Gewebsgasänderungen stärker ausgeprägt als im Histaminkollaps, da hier außer dem Kreislauf die Atmung besonders stark betroffen ist; pCO_2 steigt um 46,7% an, pO_2 fällt um 44,3% ab. Antihistaminica verhindern nicht den Eintritt des Kollapses. Bei der Wiederbelebung kommt es ziemlich rasch zur Normalisierung der Gewebsgasverhältnisse.

Beim sogenannten ESMARCH-Kollaps, der nach dem Lösen einer künstlichen Blutleere (4 Std) entsteht, zeigen sich im Verhalten der Gewebsgase einige Besonderheiten. Man unterscheidet hier 2 Stadien: 1. ein primäres Schockstadium, das durch die starke sensible Reizung der abgeschnürten Nerven und Gefäße entsteht — pCO_2 ist eher erniedrigt als erhöht, pO_2 sinkt bereits ab —, und 2. ein sekundäres Kollapsstadium, das sich erst nach dem Lösen der Blutsperre entwickelt. Dieser Zustand ist irreparabel. In die geschädigte Muskulatur und in die Haut strömt extracelluläre Flüssigkeit ein, und es entwickelt sich ein mächtiges, lokalisiertes Ödem. Das Wasser wird den übrigen Geweben des Körpers entzogen, vor allem dem Blut. Es entsteht ein Volumenmangelkollaps. Die CO_2-Spannung steigt von 42,6 auf 47,9 mm Hg an, während die O_2-Spannung von 41,7 auf 27,4 mm Hg absinkt. Nach KOLETSKY u. GUSTAFSON (1954) verlängert bei der Ratte eine Infusion von 0,9% NaCl-Lösung die Überlebenszeit um etwa 2 Std. Nach eigenen Versuchen wird

durch Padisal der Todeseintritt nicht verhindert, sondern nur etwas verzögert. Demnach scheint der Ausschwemmung sogenannter histaminähnlicher Substanzen eine untergeordnete Bedeutung zuzukommen.

Im Wasser- und Mineralhaushalt sind bei allen Kollapsformen Verschiebungen zu beobachten. Sie sind verhältnismäßig geringgradig beim Histaminkollaps und beim orthostatischen Kollaps. Hier ist z. B. der K^+-Gehalt des Serums, abgesehen vom Terminalstadium, nicht erhöht. Man beobachtet im Gegenteil eine deutliche K^+-Aufnahme in die Muskulatur, die von einer mäßigen Erhöhung des Na-Gehaltes begleitet ist. Diese Zunahme des Gesamtbasengehaltes ist als wirksame Regulation gegen die drohende CO_2-Acidosis zu deuten (Malorny, 1948). — Einschneidende Veränderungen im Mineralhaushalt treten hingegen beim Esmrach-Kollaps auf. Besonders betroffen ist die durch die Blutsperre geschädigte Muskulatur. Hier sinkt der K^+-Gehalt der Trockenmuskelfaser von 406 auf 219 mMol ab, während das Faser-Natrium von 22,4 auf 36,7 mMol ansteigt. Ravin, Denson u. Jensen (1954) geben auf Grund ihrer Abschnürungsversuche an der Ratte wesentlich höhere Na^+-Aufnahmen an. Da sich aber in ihren Versuchen der Cl^--Gehalt des Muskels fast ebenso stark vermehrt, kann es sich nicht um echte Na^+-Aufnahmen gehandelt haben, sondern vorwiegend um einen NaCl-Eintritt in den geschädigten Muskel. Die Trockensubstanz des Muskels nimmt in den eigenen Versuchen wegen Einstroms extracellulärer Flüssigkeit von 23,2 auf 17,9% ab. Dementsprechend steigen im Blut Trockensubstanz und Hämatokrit an. Ferner nimmt im Serum sowohl der absolute als auch der spezifische Kolloiddruck zu. Dies deutet auf eine Erhöhung des Wasserbindungsvermögens der Serumeiweißkörper hin. Der günstige Einfluß der NaCl-Infusion ist weniger auf eine „Auffüllung der Na-Depots im unverletzten Muskel" zurückzuführen, als auf eine Absättigung der Serumeiweißkörper mit Wasser. Hierdurch wird dem Volumenmangelkollaps entgegengearbeitet. — In den eigenen Versuchen wird nach dem Lösen der Blutsperre keine Na^+-Abgabe aus der im Kreislauf belassenen Muskulatur beobachtet, wohl dagegen ein NaCl-Verlust der Haut. Dem unverletzten Muskel kommt aber insofern eine große Bedeutung zu, als er das vom geschädigten Gewebe abgegebene K^+ in großen Mengen aufzunehmen vermag. Im Mittel wird hier eine K^+-Zunahme von 24 mMol beobachtet. Auf diese Weise wird ein bedrohlicher K^+-Anstieg im Blut lange hintangehalten.

Literatur

Haas, H.: Histamin u. Antihistamine, Bd. II. Aulendorf/W.: Editio Cantor 1952. — Koletsky, S., and G. E. Gustafson: Amer. J. Physiol. **178**, 229—232 (1954). — Malorny, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 684—729 (1948). — Ravin, H. A., J. R. Denson and H. Jensen: Amer. J. Physiol. **178**, 419—426 (1954). — Scholander, P. F.: J. of Biol. Chem. **167**, 235—250 (1947).

M. SIESS (Tübingen): Über das Verhältnis des Energieumsatzes zum Energieverbrauch bei der Muskelkontraktion (nach Versuchen an Warmblüterzwerchfellen)

Aus Glucoseverbrauch und Milchsäurebildung, ATP-Gehalt und Arbeit von überlebenden direkt gereizten Mäuse- und Rattenzwerchfellen werden unter aeroben und anaeroben Bedingungen Energieumsatz und Nutzeffekt festgestellt (s. Tab. 1). Bei einer Einzelkontraktion läßt

Tabelle 1. *Die Umsatzgeschwindigkeit von ATP in Rattenzwerchfellen*

	Aerob	Anaerob	
	+ 0,1% Glucose	+ 0,1% Glucose	ohne Glucose
Glucoseverbrauch aus P-Tyrode	4 mg/h	3,7 mg/h	~500 γ Glykogen in 10 min in 100 mg Muskel
Milchsäurebildung	0,3 mg/h	3,7 mg/h	~500 γ in 10 min
ATP-Bildung (theoret.)	644 μMol/h	41 μMol/h	6 μMol ATP in 10 min
ATP-Gehalt in 100 mg Muskel	0,3 μMol nach 1 Std	~0,01 μMol nach 1 Std	~0,1 μMol ATP nach 10 min
Umsatzgeschwindigkeit von 0,3 μMol ATP in 100 mg Muskel	$\frac{60 \cdot 60 \cdot 0{,}3}{(644—0{,}3)}$	$\frac{60 \cdot 60 \cdot 0{,}3}{(41—0{,}01)}$	$\frac{10 \cdot 60 \cdot 0{,}3}{(6—0{,}1)}$
$\frac{\text{Zeit} \cdot \text{ATP-Geh. in 100 mg Muskel (sec}\mu\text{Mol)}}{\text{ATP-Zerfall} \quad (\mu\text{Mol})}$	$\approx$ 1,6 sec	$\approx$ 26 sec	$\approx$ 30 sec
ATP-Zerfall = ATP-Bildung — ATP-Bestand			
Arbeit für 1 Kontraktion von 100 mg Muskel	~1,25 cmg	—	—
bei 100% Nutzeffekt	0,0025 μMol	—	—
Benötigte ATP-Menge bei 3% Nutzeffekt	0,08 μMol	—	—
Benöt. Zeit d. ATP-Restitution	~0,5 sec	—	—

sich bei der hohen Umsatzgeschwindigkeit kein ATP-Defizit erwarten. Erst bei länger dauernder Arbeit unter tetanischer Reizung tritt nach wenigen Sekunden ein Verlust an energiereichem Adenosinphosphat ein, der nach 1 min Reizung bis zu 45% betragen kann. Parallel damit geht der Muskel aus einem Stadium tetanischer Kontraktion in eine tetanische Starre über, die sich nach Aufhören der Reize allmählich löst, wobei gleichzeitig eine ATP-Restitution erfolgt. Es wird angenommen, daß bei

der tetanischen Starre das aktomyosingebundene ATP erschöpft ist, das erst nach Beendigung der Depolarisationsreize aus dem „Stoffwechsel-ATP" wieder ergänzt werden kann. Verminderung der Energiezufuhr durch Erstickung zu Beginn der tetanischen Reizung führt unter Rückgang des ATP um 40—45% zu schlagartigem diastolischem Stillstand, während im Stadium der tetanischen Starre nach Erstickung keine Erschlaffung mehr eintritt. Der Muskel geht dann in eine Erstickungskontraktur über.

Dauerdepolarisation durch Kaliumausgleich in der Außenlösung (+ 0,78% KCl) führt zu einer Kontraktion unter ATP-Verlust von etwa 20%. Mit dem vollen Kaliumausgleich hört die ATP-Spaltung auf und der Muskel erschlafft langsam unter Einsetzen von ATP-Aufbau. Nach Spülung mit normaler Tyrodelösung tritt volle ATP-Restitution und Kontraktionsfähigkeit wieder ein. Wie beim Tetanus kommt es bei Erstickung zu schlagartigem diastolischem Stillstand bzw. zur völligen Unterdrückung der Kaliumkontraktion nach Rückgang des ATP um etwa 40%. Bei geeigneter langsamer Depolarisation und spät einsetzender Erstickung läßt sich auch hier eine Lösung der Kontraktion verhindern, die dann in die Erstickungskontraktur übergeht.

Die Versuche zeigen ähnlich wie frühere Befunde unter Energiemangelbedingungen, daß der Muskel zur Kontraktion und nicht zur Erschlaffung Energie benötigt und daß diese Energie aus dem ATP-Stoffwechsel stammt. Ein ATP-Defizit kann durch Hemmung des Kohlenhydratstoffwechsels und damit durch mangelnde Bildung bedingt sein oder durch erhöhte Arbeitsleistung zustande kommen. Zusammenbruch des Membranpotentials durch Kaliumerhöhung in der Außenlösung führt, bis der Konzentrationsausgleich beendet ist, zu ATP-Spaltung und Kontraktion. Trotz Fortbestehen der Depolarisation kommt es wieder zur Erschlaffung, wenn noch genügend ATP am Actomyosin vorhanden ist. Beim Tetanus wird diese Weichmacherwirkung des ATP (H. H. Weber) besonders deutlich. Unsere Befunde an überlebenden Warmblüterzwerchfellen decken sich damit weitgehend mit den an Faser- und Fadenmodellen gewonnenen Vorstellungen über die Muskelkontraktion.

W. Koransky (Freie Universität, Berlin): Fraktionierte Darstellung von Nucleotiden aus dem Gehirn von Ratten im Ruhezustand und im Krampfanfall

Mit 1 Textabbildung

Bei den Untersuchungen von Herken und Mitarbeitern über die Beteiligung bestimmter Nucleotide am Zustandekommen krampfhemmender Wirkungen mußten wir uns mit methodischen Fragen zur Darstellung dieser Nucleotide befassen. Im vorigen Jahr sind von einigen

Autoren phosphorylierte Derivate des Guanosins, Uridins, Cytidins und anderer Purine und Pyrimidine isoliert und beschrieben worden, die neben den bekannten Adenosin-Verbindungen im tierischen Organismus vorkommen unter ihnen auch solche, die als prosthetische Gruppen von Fermenten Bedeutung gewonnen haben. Bei diesen Untersuchungen sind besondere Fortschritte durch die Methode der Anionen-Austausch-Chromatographie nach Cohn erzielt worden. Vor allem in der von Potter und Mitarbeitern verbesserten Form liefert sie die Möglichkeit der vollständigen Trennung dieser zahlreichen Stoffe. Wir haben daher versucht, diese Methode zur Analyse des Nucleotid-Stoffwechsels im generalisierten Krampf zu benutzen. In der Literatur ist bis jetzt nur eine einzige unvollständige Auftrennung der Nucleotide des normalen Rattengehirns von Schmitz, Potter und Mitarbeitern beschrieben worden.

Zur Gewinnung der Gehirn-Extrakte behandelten wir jeweils 20 Ratten in der von Coper beschriebenen Weise mit der Ausnahme, daß Perchlorsäure statt Trichloressigsäure zur Extraktion benutzt wurde. Nach Neutralisation und Ausfällung des Perchlorats durch Kalilauge wurden die Nucleotide an eine Anionen-Austauschersäule adsorbiert. Die fraktionierte Elution erfolgte durch eine Lösung mit kontinuierlich ansteigender Ionen-Konzentration. Dieser kontinuierliche Anstieg wird bewirkt durch Einleiten der Elutionsflüssigkeit mit Hilfe von Druckluft in ein bestimmtes Volumen Wasser. Das so entstehende Gemisch, in dem der Anteil an Elutionsflüssigkeit stetig zunimmt, wird gleichzeitig auf die Säule weitergeleitet. Ein automatischer Fraktionensammler unterteilt das Eluat in Fraktionen von 5 cm^3. Von jeder Fraktion wird die UV-Absorption bei 260 $m\mu$ gemessen und in ein Koordinatensystem eingezeichnet. Auf der Abszisse ist die Zahl der Fraktionen angegeben. Die so resultierenden Banden zeigen den Auslauf der einzelnen Stoffe aus der Säule an. Der Inhalt der entsprechenden Gläser wird gesammelt und nach Gefriertrocknung zum Teil mit Elutionsmitteln anderer Zusammensetzung auf einer neuen Säule rechromatographiert. Die Charakterisierung der einzelnen abgetrennten Stoffe erfolgte durch Aufnahme der UV-Spektren im sauren und alkalischen Medium, durch Bestimmung von Ribose und Phosphat und durch Papierchromatographie der Basen nach Hydrolyse in $HClO_4$, sowie durch Aufnahme der UV-Spektren der isolierten Basen.

Die Chromatographie ergibt zunächst 9 Hauptfraktionen. Hiervon ist nur ein Teil der Fraktionen einheitlich. Andere lassen sich durch Rechromatographie weiter aufteilen. Auf diese Weise wurden aus dem Gehirn 20 Substanzen dargestellt. Für die bisher identifizierten Stoffe sind in der Abbildung die in der Literatur üblichen Symbole eingezeichnet.

Für die vergleichenden Untersuchungen haben wir bisher 10 vollständige Auftrennungen der Gehirnextrakte von normalen Ratten und solchen im Cardiazolkrampf durchgeführt. Durch die Erregung des ZNS werden deutliche Veränderungen der Hauptfraktionen 1—9 bewirkt mit zwei Ausnahmen in den Fraktionen 3 und 7.

Bei den Banden 2, 5 u. 8 handelt es sich in der Hauptsache um die Mono-, Di- und Triphosphate des Adenins. Von diesen Substanzen nehmen innerhalb der ersten 20 sec nach Krampfbeginn die Adenin-

verbindungen mit energiereichem Phosphor, und zwar sowohl ATP wie auch ADP, bei geringer Erhöhung von AMP ab.

Daneben erhöhen sich die Banden 1 ,4 und 6. In Bande 4 ist neben UMP in der Hauptsache IMP enthalten. Die Zunahme dieser Bande spricht für eine vermehrte Desaminierung von Adenosinverbindungen im Krampf. Die Größenordnung der hier festgestellten Desaminierung

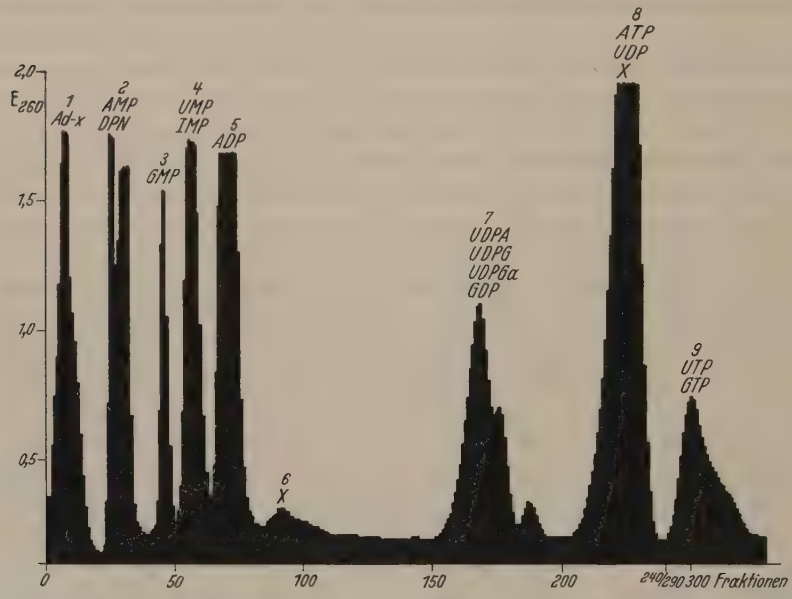


Abb. 1. Ionen-Austauschchromatogramm des säurelöslichen Extraktes aus Rattengehirn. Dowex-1,HCOO′ 1,0 · 10 cm; Mischgefäß 250 cm³; Elutionsflüssigkeit: 1—100 4 n HCOOH; 101—200 4 n HCOOH + 0,2 n $HCOONH_4$; 201—Ende 4 n HCOOH + 0,4 n $HCOONH_4$

liegt jedoch eine Zehnerpotenz tiefer als die von Richter u. Dawson gefundene Ammoniakzunahme beim Pikrotoxinkrampf. Es muß daher angenommen werden, daß die Ammoniakzunahme beim generalisierten Krampf nur zu einem Teil durch die Abspaltung der Aminogruppe des Adenins bewirkt wird.

Die Bedeutung der Zunahme von Bande 1 und 6 wird sich erst nach Identifizierung der darin enthaltenen Substanzen erkennen lassen.

Neben dem ATP in Bande 8 nehmen noch die energiereichen Triphosphate von Guanosin und Uridin in Bande 9 beträchtlich ab auf etwa die Hälfte des Normalwertes. Der erhöhte Energieverbrauch bei der vermehrten Funktion des ZNS wird also zumindest in der untersuchten Phase und bei dem angewandten Pharmakon Cardiazol zu einem Teil aus dem Abbau energiereicher Nucleotidphosphate gedeckt.

Es ist auffällig, daß die Banden 3 u. 7, welche die Mono- und Diphosphate des Uridins und Guanosins enthalten, keine Veränderungen

zeigen, obgleich die Triphosphate dieser Basen im Krampf abnehmen. Ebenso ist die AMP-Zunahme wesentlich geringer als der Abnahme des Adenosin-di- und -triphosphates entsprechen würde. Dieses Defizit kommt ebenfalls zum Ausdruck, wenn man die Summe aller Nucleotide betrachtet. Statt etwa 12 γ Mol/g Gehirn bei den normalen Tieren finden sich bei den Cardiazoltieren nur etwa 10 γMol/g. Diese Befunde lassen sich zunächst nur durch die Annahme deuten, daß bei der erhöhten Funktion des ZNS ein vermehrter Aufbau von Polynucleotiden stattfindet.

Literatur

Cohn, W. E., and C. E. Carter: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 4273 (1950). — Coper, H., Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 143 (1956). — Coper, H., H. Herken u. W. Koransky: Naturwissenschaften **1954**, 531. — Hurlbert, R. B., H. Schmitz, A. F. Brumm and V. R. Potter: J. of Biol. Chem. **209**, 23 (1954). — Richter, D., and R. Dawson: J. of Biol. Chem. **176**, 1199 (1948). — Schmitz, H., R. B. Hurlbert and V. R. Potter: J. of Biol. Chem. **209**, 41 (1954). Strominger, I. L.: Federat. Proc. **13**, 313 (1954). Kalckar, H. M.: Science (Lancaster, Pa.) **119**, 479 (1954). Kennedy, E. P., and S. B. Weiss: J. Amer. Chem. Soc. **77**, 250 (1955). — Schmitz, H., V. R. Potter, R. B. Hurlbert and D. M. White: Cancer Res.. **14**, 66 (1954).

H. Coper (Freie Universität, Berlin): Änderungen des ATP-Gehaltes im Gehirn nach Einwirkung verschiedener zentralerregender Pharmaka

Mit 3 Textabbildungen

Ratten wurden im Normalzustand und während des Krampfes dekapitiert und ihre Gehirne mit Trichloressigsäure extrahiert. Nach dem Vorschlag von Eggleston u. Hems wurden die freien Nucleotide aus den Extrakten papierchromatographisch getrennt. Die Identifizierung der einzelnen Fraktionen erfolgte durch Vergleich mit einer Testlösung eines ATP-Präparates, durch Absorptionsmessungen der aus dem Papier eluierten Substanzen und durch chemische Phosphatbestimmungen.

Als Krampfgifte dienten Cardiazol (Pentamethylentetrazol), Mintacol (p-Nitrophenyldiaethylphosphat) und Scillirosid. Jede Form des Krampfanfalles führte zu einer Verminderung des ATP im Gehirn. Im Gegensatz zu den Befunden von

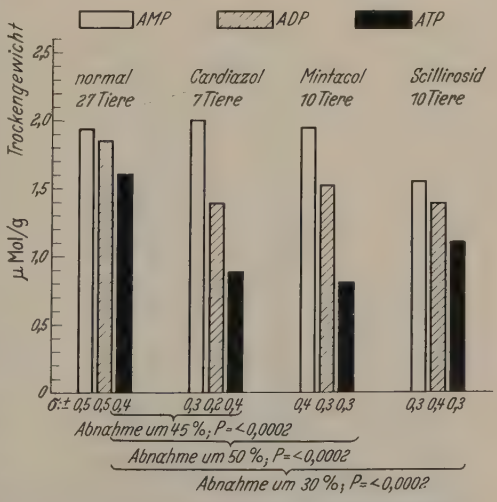


Abb. 1. Abnahme von ATP im Gehirn während des Krampfanfalles nach Einwirkung verschiedener Pharmaka

Abb. 2. Papierchromatographische Auftrennung von Gehirnextrakten

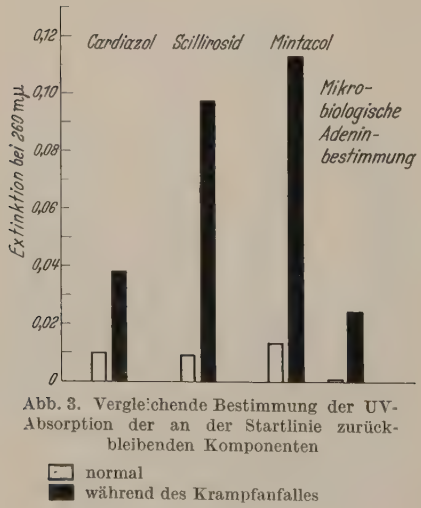


Abb. 3. Vergleichende Bestimmung der UV-Absorption der an der Startlinie zurückbleibenden Komponenten

Klein u. Olson nimmt auch der Gehalt an ADP während des Cardiazolkrampfes ab. Dabei ist nur eine unbedeutende Vermehrung von AMP festzustellen. Auch bei der Vergiftung mit dem Cholinesterasegift nimmt der AMP- oder ADP-Gehalt nicht zu.

Bei den über Stunden und Tage anhaltenden Scillirosidkrämpfen sind sogar alle Fraktionen vermindert (Abb. 1).

Neben den 3 Hauptfraktionen sieht man in den Gehirnextrakten normaler Ratten deutlich abgegrenzt eine 4. Fraktion, deren UV-absorbierender Anteil sich im Krampf nicht ändert.

Besonders bemerkenswert ist, daß an der Startlinie der Chromatogramme der im Krampfanfall getöteten Tiere eine Fraktion auftritt, die bei normalen Tieren nur angedeutet ist (Abb. 2). Ihre Absorption im UV-Bereich ist für keine der bekannten Purin- oder Pyrimidinverbindungen charakteristisch. Eine Darstellung der Extinktionseinheiten dieser Substanz bei 260 mμ zeigt deutliche Unterschiede zwischen dem normalen Zustand und dem generalisierten Krampfanfall (Abb. 3). Außerdem ergeben sich noch auffällige Differenzen zwischen den verschiedenen Krampfgiften. Im Falle des

Mintacolkrampfes wurde zusätzlich eine mikrobiologische Auswertung der Eluate durch eine Adenin-bedürftige Mutante von Neurospora crassa mit herangezogen und dabei gefunden, daß der Adeningehalt bei weitem nicht dem bei 260 mμ ermittelten Extinktionswert entspricht. Gehirnextrakte unbehandelter Tiere enthalten in dieser Fraktion überhaupt kein Adenin.

Ob durch die Zunahme dieser Fraktion die Abnahme an freien Nucleotiden völlig gedeckt wird, ist noch nicht sicher, da die Analyse der chemischen Struktur dieser Verbindungen nicht abgeschlossen ist.

H. Rašková, O. Fialová und B. Rybová (Prag): Zur Pharmakodynamik von ATP

Es wurde an Kaninchen und Katzen festgestellt, daß ATP, und auch AMP, die Sensibilität der Chemoreceptoren im Sinus caroticus, sowie in anderen humoral isolierten Gegenden (A. mesent. sup, A. renalis) für Acetylcholin und KCl bedeutend erhöht. Wenn die Reaktivität der Receptoren durch Einwirkung von bakteriellen Giften (Typhusendotoxin, Toxin Shigella shigae) auf Acetylcholin und KCl blockiert wurde, gelang es durch Zugabe von ATP und AMP zur Perfusionsflüssigkeit, die Reaktivität wieder herzustellen.

Die Wirkung von ATP und AMP auf die höhere Nerventätigkeit von Ratten wurde mittels zweier positiver und eines negativen bedingten Futterreflexes untersucht. Kleine Dosen von ATP (1 mg/kg) führten oft zu einer Enthemmung der Differenzierung, welche binnen 48 Std zur Norm zurückkehrte. Größere Dosen führten zu einer teilweisen bzw. kompletten Inhibition der bedingten Reflexe, welche binnen 24—48 Std zur Norm zurückkehrten. AMP in denselben Dosen hatte keine Wirkung auf die höhere Nerventätigkeit der Tiere. An großen Gruppen von Mäusen wurde festgestellt, daß ATP und AMP in gleicher Weise die Giftigkeit von einer Reihe von bakteriellen Toxinen vermindern. Dies wurde für das Shigella Shigae Toxin, Toxin Salm. Typhi, Streptolysin O, Dysenterieendotoxin, Diphtherietoxin, nicht aber für Tetanustoxin festgestellt. Dabei zeigt sich eine sehr interessante Abhängigkeit der Wirkung von ATP von dem Zeitpunkt der Injektion (die Wirkungen sind bei intravenöser und intraperitonealer Verabreichung gleich). Bei gleichzeitiger Applikation von ATP und Toxin konnten wir keine Wirkung oder sogar eine Verschlechterung beobachten. Die optimalen Wirkungen wurden beobachtet, wenn ATP oder AMP knapp vor dem Zeitpunkt, bei dem das Gift die maximale Mortalität verursacht, appliziert wurden. Die Befunde sind sowohl vom theoretischen Standpunkt, da sie auch mit AMP, d.h. ohne makroergische Bindung, zustandekommen, wie vom praktischen Standpunkt interessant.

S. Milković und Z. Supek (Zagreb): Über die Wirkung von 5-Oxytryptamin (Serotonin) und Lysergsäurediäthylamid (LSD) auf das Hypophysen-Nebennierenrinde-System

Serotonin verursacht eine Verminderung der Eosinophilen im peripheren Blut und eine Herabsetzung der Ascorbinsäurekonzentration in den Nebennieren[1, 2]. Dieser Aktivierung des Hypophysen-Nebennierensystems wird in thromboembolischen Zuständen eine gewisse Rolle zugeschrieben[1].

Um mit dem Serotoningehalt des Plasmas vergleichen zu können, wollten wir die kleinste aktive Dose des Serotonins ermitteln.

Als Kriterium für die Aktivierung der genannten Achse wurde die 50- und mehrprozentige Verminderung der zirkulierenden Eosinophilen im Rattenblute genommen. Mit 15 und 30 μg/100 g Serotonin konnte keine Eosinopenie festgestellt werden. Erst bei Benützung von 300 μg/100 g wurde ein Abfall der Eosinophilen bemerkt. Das Vorkommen solcher Konzentrationen ist auch in pathologischen Zuständen unwahrscheinlich.

LSD ist als ein mächtiger und spezifischer Antagonist von Serotonin bekannt. Deshalb war es interessant, diesen Antagonismus im vorliegenden Fall zu prüfen. Es zeigte sich, daß das LSD in Dosen die sonst wirksam sind (2 und 12 μg/100 g), weder imstande ist, selbst eine eosinopenische Reaktion zu verursachen, noch eine solche durch Serotonin ausgelöste zu verhindern.

Literatur

[1] Bertelli, A., G. Cantone e L. Martini: Atti Soc. lombarda Sci. med. e biol. **9**, 10 (1954). — [2] Halberg, F.: Amer. J. Physiol. **179**, 309 (1954).

A. Cerletti und H. Konzett (Basel): Spezifische Hemmung von 5-Oxytryptamin-Effekten durch Lysergsäurediäthylamid und ähnliche Körper

5-Oxytryptamin (Serotonin, Enteramin; im folgenden mit 5OT bezeichnet), eine körpereigene Substanz mit vielfältigen Wirkungen, hat eine intensive Suche nach Antagonisten ausgelöst. d-Lysergsäurediäthylamid (Stoll u. Hofmann, 1943; im folgenden mit LSD bezeichnet) wurde schon frühzeitig als wirksamster spezifischer Hemmstoff erkannt (Gaddum, 1952). Sein eigenartiger Effekt auf Bewußtsein und Psyche ließ sogar eine ursächliche Beziehung zum Antagonismus von 5OT vermuten (Amin u. a., 1954).

Wir haben, ausgehend und vergleichend mit LSD, eine Reihe verwandter Lysergsäurederivate auf ihre Anti-5OT-Wirkung untersucht, und zwar am isolierten Rattenuterus (nach Stilboestrolvorbehandlung),

an dem 5OT ein Kontraktion auslöst. Substanzen mit starker Anti-5OT-Wirkung am Rattenuterus wurden außerdem an der isoliert durchströmten Rattenniere geprüft, an der 5OT die Gefäße verengt. In Ergänzung dieser Versuche in vitro, die sich zur quantitativen Bestimmung von Antagonismen am besten eignen, haben wir die wirksamsten Verbindungen in vivo geprüft, und zwar an Katzen (Chloralose-Urethan-Narkose bzw. Spinaltiere) hinsichtlich des 5OT-Antagonismus an Nieren- und Darmgefäßen (Stromuhr) und an der Bronchialmuskulatur (Methode Konzett-Rössler) — 5OT wirkt gefäßverengernd bzw. bronchokonstriktorisch — sowie an Mäusen bezüglich Hemmung der 5OT-bedingten Barbiturat-Potenzierung.

Stereoisomere des LSD. Die wirksame Verbindung ist das d-Lysergsäurediäthylamid. Die l-Form sowie d- und l-Iso-Lysergsäurediäthylamid (Stoll u. Hofmann, 1955) sind mehr als 100mal schwächer 5OT-hemmend wirksam.

Hydrierte LSD-Verbindungen. Dihydro-LSD (Stoll u. Hofmann, 1955; Wegfall der Doppelbindung zwischen C9—C10) ist 1,6mal, Lumi-LSD (Stoll u. Schlientz, 1955; mit Wasseranlagerung ebenfalls an die 9—10-Doppelbindung) mehr als 100mal schwächer wirksam.

Am Amid-N monosubstituierte Amide der d-Lysergsäure. Lysergsäure-Äthyl-, -Propyl- und -Isopropyl-Amid (Stoll u. Hofmann, 1955) erweisen sich 8,5- bzw. 2,5- bzw. 5mal schwächer 5 OT-hemmend wirksam. Das Butylamid der d-Lysergsäure (Stoll u. Hofmann, 1955) ist die wirksamste Verbindung dieser Gruppe und nur 1,5mal schwächer als LSD.

Am Amid-N disubstituierte Amide der d-Lysergsäure. Lysergsäure-Dimethyl-, -Diisopropyl- und Dibutyl-Amid (Stoll u. Hofmann, 1955) sind 5- bzw. 4- bzw. 3mal schwächer wirksam. Das Lysergsäurepyrrolidid, das formal ein ringgeschlossenes LSD darstellt (Stoll u. Hofmann, 1955), ist bedeutend (20mal) schwächer wirksam.

Substitutionsprodukte des LSD[1]. Acetyl-LSD, durch Einführung eines Acetylrestes in 1-Stellung gewonnen, ist etwa 2mal stärker 5OT-hemmend wirksam. Brom- und Jod-LSD, durch Einführung von Brom und Jod in 2-Stellung bereitet, sind 1,5mal stärker bzw. 2mal schwächer 5OT-hemmend wirksam. Oxymethyl-LSD, durch Einführung einer Oxymethylgruppe in 1-Stellung gewonnen, ist 1,5mal schwächer wirksam.

Acetyl-LSD und Brom-LSD, die unter allen geprüften Substanzen am Rattenuterus die stärkste 5OT-Hemmung bewirkt hatten, wurden auch an der Rattenniere sowie in vivo hinsichtlich ihres 5OT-Antagonismus untersucht. Das Ergebnis ist in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt.

[1] Diese Verbindungen sind vorerst nur in Form einer Patentanmeldung publiziert.

Tabelle 1

	Isolierter Ratten-Uterus	Isolierte Ratten-Niere	Periphere Gefäße Katze	Bronchial-muskulatur Katze	Barbiturat-Potenzierung Maus
LSD	1	1	1	1	1
Acetyl-LSD	2	1	1	1	0,8
Brom-LSD	1,5	1,4	1	0,7—1	1

Im Brom-LSD liegt ein Körper vor, der an allen verwendeten Testobjekten eine hohe Anti-5OT-Aktivität zeigt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, daß Brom-LSD nicht die gleiche Veränderung von Bewußtsein und Psyche bewirkt wie LSD. Brom-LSD hat am Menschen bis zu 20 μg/kg (das ist 20mal mehr, als die wirksame Dosis von LSD beträgt) keine LSD-ähnliche Wirkung, sondern erzeugt nur das Gefühl von Müdigkeit. Am Beispiel des Brom-LSD zeigt sich also, daß 5OT-Antagonismus in vitro (und in vivo) und Bewußtseinsänderung am Menschen keineswegs immer parallel verlaufen.

Literatur

Amin, A. H., T. B. B. Crawford and J. H. Gaddum: J. of Physiol. **126**, 596 (1954). — Gaddum, J. H.: J. of Physiol. **121**, 15P (1953). — Konzett, H., u. R. Rössler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **195**, 71 (1940). — Stoll, A., u. A. Hofmann: Helvet. chim. Acta **26**, 944 (1943).; **38**, 421 (1955) — Stoll, A., u. W. Schlientz: Helvet. chim. Acta **38**, 585 (1955).

Diskussion. Hotovy (Darmstadt): Der pressorische Effekt von 5-OT am Blutdruck bei wachen Carotis-Schlingen-Hunden wird durch eine Thiobarbiturat-Narkose umgekehrt. Diese Blutdrucksenkung des 5-OT kann nicht mit den üblichen 5-OT-Antagonisten beeinflußt werden (LSD stand nicht zur Verfügung). Yohimbin schwächte zwar den depressorischen Effekt etwas ab, entscheidend war jedoch hierbei die Abflachung der Narkosetiefe durch die analeptische Wirkung des Yohimbin. Die Erhöhung des Druckes im rechten Vorhof bei narkotisierten Hunden nach 5-OT-Injektionen kann mit Serotonin-Antagonisten nur unwesentlich beeinflußt werden. Eine kurzdauernde Hypoxie oder mehrfach wiederholte Adrenalin-Injektionen können bei narkotisierten Hunden den depressorischen 5-OT-Effekt in einen pressorischen umkehren. Aus diesem Grunde ist eine Abwertung der Serotonin-Antagonisten nur unter Zurhilfenahme von anspruchsvollen Methoden möglich.

Zetler (Kiel): Es wird darauf hingewiesen, daß an Herzen von Mollusken die bekannten pharmakologischen Antagonismen nur schwer auslösbar sind. Hier wirken Acetylcholin (ACH) negativ, Histamin und 5-OT positiv inotrop. Nach Prosser (Biol. Bull. 78, 92, 1940) wirkt unter diesen Bedingungen Atropin nicht gegenüber ACH, nach eigenen Untersuchungen (Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 345, 1954) versagen auch Neoantergan gegen Histamin wie Dihydroergotamin gegen 5-OT. Gleichwohl sind an diesen Objekten Antagonismen prinzipiell möglich. So wirkt anstatt von Atropin Mytolon gegen ACH antagonistisch (Luduena and Brown, J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **105**, 232, 1952). Es wird angefragt, ob inzwischen 5-OT-Antagonisten bekanntgeworden sind, die auch an Mollusken-Herzen wirken.

K. H. Ginzel (Birmingham): Die Wirkung von d-Lysergsäurediäthylamid (LSD) auf Kreislaufreflexe

LSD wurde mittels einer Feldberg-Sherwood-Kanüle in den lateralen Gehirnventrikel von Katzen in Chloralosenarkose injiziert. Dosen von 100—200 μg (0,2 ml) bewirkten eine Verminderung oder Aufhebung der Blutdrucksteigerung nach Asphyxie, elektrischer Reizung des zentralen Stumpfes des durchschnittenen N. ischiadicus und beidseitiger Abklemmung der Halsschlagadern. Die Blutdruckhöhe an sich verminderte sich nach LSD entweder gar nicht oder geringfügig (20 mm Hg), nur vereinzelt wurde ein stärkerer Druckfall beobachtet. Die Einschränkung des Okklusionsreflexes war nicht die Folge des fallweise erniedrigten Blutdruckniveaus, da stärkere Drucksenkungen, z. B. nach intravenöser LSD-Injektion, die Reflexhöhe wesentlich weniger herabsetzten. Durchtrennung der Vagi und Atropinisierung waren ohne Einfluß auf die gelegentliche Drucksenkung. Da LSD die Spontanatmung meistens deutlich einschränkte, wurde in der Mehrzahl der Versuche zur Erhaltung konstanter Bedingungen künstliche Atmung verwendet.

Durch abwechselnde Beatmung des Tieres mit Luft und reinem Sauerstoff kann das Ausmaß des Okklusionsreflexes verändert werden. Der Unterschied in der Reflexhöhe enthüllt den Anteil der durch lokale Hypoxie gereizten Chemoreceptoren am Gesamtreflexerfolg. LSD beseitigte diesen Unterschied, so daß, unabhängig von dem verwendeten Atemgas, zu gleicher Höhe reduzierte Reflexe ausgelöst werden konnten. Pressorische Wirkungen nach lokaler Injektion von Kaliumcyanid und Sebacinylbischolin, einem stark nicotinartig erregenden Stoff, in das Carotissinus-Gebiet wurden durch LSD vermindert oder aufgehoben. Der Okklusionsreflex wurde zur gleichen Zeit in einem wesentlich geringerem Ausmaß betroffen. Hingegen war die depressorische Wirkung nach elektrischer Reizung eines Carotissinus-Nerven entweder unverändert oder nur relativ zum gesenkten Blutdruckniveau vermindert. Wenn die Reizung des Carotissinus-Nerven von einem pressorischen Effekt gefolgt war, also die Impulse in Chemoreceptorenfasern überwiegten, so verminderte LSD diesen in einem ähnlichen Verhältnis wie den Blutdruckanstieg während Carotidenabklemmung.

Diese Befunde gestatten die Annahme, daß LSD, in den inneren Liquorraum eingebracht, vornehmlich die Reflexe, die von den Chemoreceptoren (Carotis-Gebiet) ausgehen, hemmt. Intravenöse Injektion der intraventrikular wirksamen Dosen und lokale Injektion von LSD in das Carotissinus-Gebiet waren ohne Wirkung auf diese Reflexe. Wiederholte intraventrikulare Injektion von 5-Hydroxytryptamin in Dosen von 10 bis 200 μg zeigte weder eine Eigenwirkung des 5HT, noch beeinflußte

dieses die durch LSD verursachte Reflexhemmung. Noradrenalin, Acetylcholin, Histamin (100—200 μg), Atropin und Hexamethonium (1 mg) erwiesen sich ohne Wirkung auf den Okklusionsreflex und Blutdruckanstieg nach Chemoreceptorenerregung.

Z. Votava und I. Podvalová (Prag): Über die pharmakologische Untersuchung synthetischer Wehenmittel. Substituierte N-Benzylpiperidine und 3,4-Dimethoxybenzylamine

Es wurden die pharmakologischen Eigenschaften von 31 Stoffen mit besonderer Berücksichtigung ihrer uterotonischen Wirkung untersucht. 21 der Stoffe waren substituierte N-Benzylpiperidine, 10 substituierte 3,4-Dimethoxybenzylamine. Bei allen Kaninchen wurde die uterotonische Wirkung mit einer eigenen Modifikation der Barbourschen Methode in situ geprüft. Außerdem wurde die Wirkung aller Stoffe auf den Blutdruck von Kaninchen und ihre Toxizität an Mäusen festgestellt. Die Stoffe wurden intravenös verabreicht.

Die größte uterotonische Wirksamkeit weisen jene Substanzen auf, bei denen 2, eventuell auch 3 Wasserstoffatome am Phenylkern substituiert sind. Nicht substituierte oder monosubstituierte N-Benzylpiperidine sind verhältnismäßig wenig wirksam. Bei den disubstituierten gelang uns der Nachweis, an welcher Stelle die Substitution am vorteilhaftesten ist. Die weitaus wirksamsten Substanzen sind jene mit der Substitution 2,5.

In der zweiten Stoffgruppe handelt es sich um Analoga der erfolgreichsten Substanz der ersten Gruppe des N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-piperidins am Piperidinkern. In dieser Gruppe sind wesentlich geringere Unterschiede in der uterotonischen Wirkung zwischen den einzelnen Substanzen.

Vom therapeutischen Standpunkte wurden die besten Eigenschaften bei N-(3,4-Dimethoxybenzyl)-piperidiniumchlorid ermittelt, dessen uterotonische Wirkung auch klinisch erwiesen wurde. Die größte uterotonische Wirkung hatte N-(2-Oxy-5-methoxy)-piperidiniumchlorid, das jedoch den Blutdruck erhöhte.

H. Höller und A. Kiehtreiber (Wien): Die Auswertung sympathicolytischer Stoffe an der isolierten Kaninchenmilz

Die quantitative Bestimmung von sympathicolytischen Stoffen, speziell Secalealkaloiden stellt eine Aufgabe dar, die relativ häufig gestellt wird. Zu ihrer Lösung stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, die die Aufhebung der Adrenalinwirkung an isolierten Organen verschiedener Tiere zur Auswertung benützen.

Es interessierte uns nun, ob auch die isolierte Milz sich für die Auswertung von Sympathicolytica eigne. Seit langem ist bekannt, daß am Ganztier durch Adrenalin eine Milzkontraktion hervorgerufen werden kann. Die Kontraktion der isolierten Milz unter dem Einfluß von Adrenalin wurde gleichfalls mehrfach beschrieben; MARTINETTI u. DONATELLI fanden schon 1940, daß die Adrenalinkontraktion der isolierten Milz durch Ergotamin aufgehoben wird, ohne jedoch zu entscheiden, ob diese Ergotaminwirkung dosisabhängig sei.

Die Auswertung erfolgt so, daß eine Kaninchenmilz der Länge nach halbiert wird und jeder Streifen in der üblichen Weise in ein 20 ml-Gefäß einer MAGNUS-Apparatur eingehängt wird. Als Badflüssigkeit dient Ringer-Lösung. Auch das Adrenalin wird in Ringer-Flüssigkeit gelöst und von einem zweiten Vorratsgefäß her zugeführt. Es werden alternierend mit der zu prüfenden Lösung gleichbleibende Dosen der Vergleichssubstanz gegeben. Die Menge der unbekannten Lösung wird so lange variiert, bis Wirkungsgleichheit erzielt ist.

Um die Leistungsfähigkeit der Methode zu prüfen, ließen wir 10 verschiedene Lösungen herstellen, deren Gehalt an Ergotamintartrat uns nicht bekanntgegeben wurde und bestimmten deren Wirkungswert. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt die Tab. 1. Der maximale Fehler bei 10 Versuchen betrug 17%, der durchschnittliche Fehler etwa 5,2%. Es sei vermerkt, daß für die Bestimmung der Tabellenwerte je 3 bis maximal 6 Versuche notwendig waren. In gleicher Weise konnten synthetische Sympathicolytica wie z. B. Opilon und Dibenamin bestimmt werden.

Tabelle 1

Lösung Nr.	Ergotamingehalt in γ/ml		Fehler in %
	tatsächlich	gefunden	
1	2,5	2,5	—
2	1,6	1,4	12,5
3	2,0	2,0	—
4	7,5	6,3	16,0
5	10,0	10,0	—
6	6,7	6,8	1,5
7	1,0	0,83	17,0
8	2,5	2,5	—
9	3,5	3,33	4,9
10	4,5	4,5	—

Da die Methode vor allem zur Bestimmung von Ergotamin bzw. Secaleextrakt in pharmazeutischen Spezialitäten vom Typus des Bellergals benötigt wurde, mußten die in solchen Präparaten zusätzlich vorhandenen Stoffe auf ihre Fähigkeit geprüft werden, die Milzversuche zu beeinflussen. Barbiturate zeigten keine Wirkung; Atropin bzw. Extractum Belladonnae wirkten ähnlich dem Ergotamin, jedoch erst bei etwa

100—200mal höherer Dosierung. Interessant ist, daß die Adrenalinkontraktion durch muskulotrope Spasmolytica schon in Dosen von 30 γ/20 ml an beeinflußt wird, während Atropin erst bei 75—100 γ/20 ml zu wirken beginnt. Da von Ergotamintartrat zur Erzielung der gleichen Effekte nur 0,25—0,5 γ/20 ml benötigt werden, ist eine Störung durch Begleitstoffe bei der Untersuchung von Spezialitäten kaum zu befürchten. Die Reaktion der Milz auf eine Reihe weiterer Stoffe, vor allem andere Secalealkaloide ist zur Zeit Gegenstand weiterer Untersuchungen. Hydrierte Alkaloide wirken weitaus stärker, wasserlösliche Alkaloide zeigen nur außerordentlich geringe Effekte. Diese Befunde stehen mit den Ergebnissen, die mit anderen Methoden erzielt wurden, in vollem Einklang.

Die Vorteile der geschilderten Methode liegen in der erheblichen Genauigkeit bei kleinen Versuchszahlen, der geringen Störungsempfindlichkeit und der Möglichkeit, schon mit einem einzigen Versuch brauchbare orientierende Aussagen zu erhalten.

Diskussion. Lange (Düsseldorf): Dank einer Mitteilung von Höller war es möglich, die gleichen Versuche in Düsseldorf an der isolierten Kaninchenmilz durchzuführen. Die vorliegenden einjährigen Erfahrungen bestätigen die Befunde Höllers in vollem Umfange. Die Methode ist die beste. Sie liefert bei der Auswertung des Wirkungsverhältnisses von Ergotamin und Ergocristin andere Verhältniszahlen als die Versuche an der Meerschweinchenblase. Bei dieser ist Ergocristin 2,5—3mal stärker wirksam als Ergotamin, an der Milz dagegen nur 1.5 bis 1,6mal.

Z. Votava (Prag): Biologische Bestimmung von wasserlöslichen Mutterkornalkaloiden auf Grund der mydriatischen Wirkung an Mäusen

Ausgehend von der Methode von Pulewka wurde eine Methode der biologischen Wirkungsbestimmung von wasserlöslichen Mutterkornalkaloiden entwickelt.

Die geprüften Stoffe wurden in der Dosis 10 und 20 mg/kg intravenös den Mäusen injiziert. Die Größe der Pupille wurde 2mal vor und 15 min nach der Applikation der Stoffe gemessen. Die Mydriase wurde in Prozent der Vergrößerung ausgedrückt. Die Resultate wurden statistisch verarbeitet. Die Fehler der Resultate waren für $P = 0{,}95$ bei Gruppen von 15 Mäusen 15—21%. Methylergometrin weist auf Grund unserer Versuche 186% (174—198%) der Wirksamkeit des Ergometrins auf.

Die mydriatische Wirkung der wasserlöslichen Mutterkornalkaloiden beruht auf ihren sympathomimetischen Eigenschaften. Dies wurde dadurch bewiesen, daß periphere (Regitin) und zentrale (Hydergin) Sympathicolytica quantitativ die mydriatische Wirkung des Ergometrin und Methylergometrin antagonisieren.

E. Busch (Berlin): Über die Erregbarkeit des Rattenuterus im Cyclus

Der Uterus nimmt unter den Organen eine Sonderstellung ein. Durch die cyclische Änderung der hormonalen Stimulierung ändert er seine Reaktionslage cyclisch — und gibt uns viele Rätsel auf. Die Reaktion verschiedener Stoffe in Abhängigkeit vom Cyclus wurde am Rattenuterus geprüft (Gewicht der Tiere 150—200 g), weil die Ratte einen gut zu überblickenden Cyclusablauf hat (tägliche Vaginalabstriche). Es kamen nur die Tiere in den Versuch, die einen regelmäßigen Ablauf zeigten. — Bedenken könnten gegen die Verwendung von infantilen Tieren geäußert werden, wenn sie den Dioestrus-Tieren gleichgesetzt werden, da die Situation des nicht geschlechtsreifen Uterus eine andere ist. Ebenso geht es nicht an, die mit Oestradiol vorbehandelten Tiere nur nach ihrem Vaginalabstrich als Oestrus-Tiere zu bezeichnen. Augustin u. Graf konnten den Beweis dafür erbringen, daß der positive Abstrich kein Garant für eine erfolgte oestrale Uterusumwandlung ist.

Als Nährlösung wurde immer Tyrodelösung verwendet. Der $CaCl_2$-Gehalt wurde variiert. Für die Aussage, ob eine erregende Wirkung vorlag oder nicht, wurde die Tyrodelösung mit 5 mg-% $CaCl_2$ verwendet. Zum Studium des Wirkungsbildes aber und zur deutlichen Erfassung der erregenden und hemmenden Dosis von Arterenol wurde die Lösung mit 20 mg-% $CaCl_2$ genommen.

Viele Autoren haben festgestellt, daß es durch Acetylcholin zu Frequenz-, Amplituden- und Tonuserhöhung kommt; unabhängig vom Cyclusstadium. Nach unserer Ermittlung mit der $CaCl_2$-armen Tyrodelösung betrug die Grenzkonzentration, bei der 100% reagierten, 5×10^{-8}. Im Gegensatz dazu soll es nach Simionescu-Carapancea bei Ratten und Mäusen im Oestrus nach 0,1, 1 und 10 γ zu einer Hemmung der Kontraktionen, nach 100 γ aber zu einer Erregung kommen. In einigen orientierenden Versuchen konnten wir diese Angaben nicht bestätigen. Durch Serotonin kommt es nach kleineren Dosen zu einer Frequenzvermehrung und Amplituden-Vergrößerung. Nach größeren Dosen tritt außerdem eine Tonuserhöhung auf. Von einer bestimmten Dosis ab, bei uns 10^{-8}, kann man auch hier keine Abhängigkeit vom Cyclus beobachten. Untersucht man aber im niedrigeren Dosenbereich, dann wird eine deutliche Oestrus-Bevorzugung sichtbar. Arterenol hat nur in einem bestimmten Dosenbereich erregende Wirkung, nach unserer Ermittlung bis 10^{-8}. In diesem Bereich ist eine Oestrusabhängigkeit mit Sicherheit festzustellen. Arterenol verursacht hauptsächlich Amplituden-Vergrößerung und Frequenzvermehrung. Die Tonussteigerung ist, wenn überhaupt vorhanden, nicht sehr deutlich ausgeprägt. Etwas größere Mengen, etwa 5×10^{-8}, zeigen schon deutliche Hemmung. Mit diesem Ergebnis stehen wir in scheinbarem Gegensatz zu Holtz u. Luduena,

bestätigen aber die Versuche von Mann u. West. Der Gegensatz, zu Holtz ist nur scheinbar, weil auch Holtz positive Arterenol-Reaktionen an mit Prolan vorbehandelten Ratten sah. Allerdings nur in 2 von 8 Versuchen. Von den Arzneimitteln untersuchten wir Ergotamintartrat und fanden es im Oestrus bevorzugt wirksam. Nach Ergotamin kommt es zu einer starken Tonisierung des Organs, die schon nach kleinen Dosen auftritt. Nach der Tonuserhöhung treten rhythmische Kontraktionen auf. Histamin löste an der für diesen Stoff unempfindlichen Ratte auch Kontraktionen aus, allerdings nur im Di- und Met-Oestrus und erst nach sehr hohen Dosen. (10^{-6}). Untersuchungen am Meerschweinchen als dem empfindlichen Histamintier zeigten im Gegensatz dazu Kontraktionen schon nach 5×10^{-8} bei 100% ohne Abhängigkeit vom Cyclus.

So interessant diese Versuchsergebnisse sind, darf man doch nicht in den Fehler verfallen, von diesen Resultaten auf die physiologische Wirklichkeit schließen zu wollen. Bei dieser rein deskriptiven Darstellung sind alle Regelsysteme völlig außer Acht gelassen worden. Man kann nur sagen, welche Stoffe wirksam werden könnten, nicht aber, ob und wie sie wirksam werden. Will man auf Grund anderer Arbeiten Spekulationen anstellen, dann wird klar, daß das Maximum an Uterusbewegung zur Zeit des Oestrus stattfindet und daß also zu diesem Zeitpunkt Oxytocica wirksamer werden müssen. Warum die erwähnten Stoffe zu diesem Zeitpunkt wirksam werden, könnte auf einer durch Oestradiol und Oxytocin hervorgerufenen besonderen Tonuslage beruhen. Ihr Vorhandensein könnte aber auch die veränderte Tonuslage für die Oxytocinwirkung schaffen. Auszuschließen von diesen Überlegungen ist wohl Histamin.

Diskussion. v. Brücke (Wien): Die Verwendung von Uteri in genau definierten Phasen des Cyclus ist bei der Verfolgung der Aktivität hoch gereinigter Oxytocin-Präparate besonders wichtig.

Muschaweck (Moers): Die von Busch am isolierten Organ mit Arterenol erzielten Ergebnisse stimmen überein mit den von Kruck in Heidelberg erhobenen Befunden am Ganztier, die seinerzeit nicht völlig geklärt werden konnten. Hier hat die Arbeit von Busch eine wertvolle Ergänzung und Klärung gebracht.

G. Peters (Mainz): Die Wirkung von Hypophysen-Hinterlappenhormonen auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte

Dosen von 1—100 mE Vasopressin/Ratte s.c. wirken nur bei vorheriger peroraler Wässerung der Tiere mit Wasser oder 0,3%iger NaCl-Lösung eindeutig und stark antidiuretisch. Bei Wässerung mit 0,6 und 0,9%iger NaCl-Lösung tritt keine oder nur eine geringfügige

antidiuretische Wirkung auf. Bei Wässerung mit 1,8%iger NaCl-Lösung wirken 1—30 mE Vasopressin, bei Wässerung mit 0,9%iger Kochsalzlösung 100 mE Vasopressin diuretisch. — Die antidiuretische Wirkung von Vasopressin vermag nicht, die Diurese auf das Maß (mehrere Stunden) durstender Tiere herabzusetzen. — Oxytocin wirkt in Dosen von 10 bis 60 mE/Ratte bei Wässerung mit 0,9%iger NaCl-Lösung diuretisch. Bei Wässerung mit Wasser hat es keinen Einfluß auf die Diurese. Bei durstenden Ratten wird die Diurese durch 30—500 mE Oxytocin/Ratte verdoppelt, durch 0,5—500 mE Vasopressin/Ratte nicht beeinflußt. Nach subtotaler Nephrektomie wird die diuretische Wirkung von Vasopressin bei Wässerung mit 0,9%iger NaCl-Lösung wesentlich verstärkt, die antidiuretische Wirkung bei Wässerung mit Wasser leicht abgeschwächt. Vasopressin bewirkt in Dosen von 10—100 mE/Ratte eine Steigerung der Natrium- und Chloridkonzentration im Harn unabhängig von der per os gegebenen Salzmenge und somit der Salzkonzentration im Harn der Kontrolltiere. Oxytocin wirkt ebenso, aber schwächer. Die Kaliumausscheidung im Harn steigt immer in Abhängigkeit von der Natriumausscheidung an. Es wird gefolgert, daß die Einschränkung der Wasserausscheidung bei Erhöhung des Salzgehaltes der extracellulären Flüssigkeit bei der Ratte *nicht* durch Hypophysenhinterlappenhormone vermittelt werden kann, die unter diesen Umständen *diuretisch* wirken. Die Hypophysenhinterlappenhormon-Ausscheidung bei Durst und Salzaufnahme vermag lediglich die Salzausscheidung im Harn unter gewissen Einschränkungen zu fördern.

Diskussion. Schmid (Heidelberg): Anfrage, ob Nierenfunktionsprüfungen (Filtration und Plasmastrom-Bestimmungen) durchgeführt werden, da hier weitere Aufklärung der Rückresorptionsmechanismen zu erwarten wären.

Schlußwort. Peters: Die Untersuchung der Beeinflussung der Inulin-Clearance (und der PAH-Clearance) der Ratte durch HHL-Hormone unterblieb zunächst, weil wir bei dieser Tierart in einer größeren Zahl von Versuchen und in Übereinstimmung mit einigen Voruntersuchern eine lineare Abhängigkeit der Inulin-Clearance von der Diurese fanden. Die Deutung der Inulin-Clearance-Werte der Ratte stößt deshalb zur Zeit auf Schwierigkeiten.

H. Brunner (Mainz): Die Beeinflussung der renalen Wasser- und Salzausscheidung normaler und hyposektomierter Ratten durch Nebennierenrindenhormone

Die vorliegenden Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Klärung der Frage liefern, ob und inwieweit der Ausfall der Hypophyse Störungen des Wasser- und Mineralhaushalts verursacht, die nicht durch die sekundäre N.N.R.-Atrophie zu erklären sind.

Bei normalen Ratten liegt die maximale Ausscheidungsgeschwindigkeit für Wasser (= Maximaldiurese MD) nach oraler Gabe von physiologischer Kochsalzlösung viel niedriger als nach oraler Gabe von Wasser. Bei 12—14 Wochen hyposektomierten Ratten ist die MD bei Wässerung mit Wasser oder physiologischer NaCl-Lösung sehr stark herabgesetzt: Die Verhältnisse liegen ähnlich wie bei adrenalektomierten Tieren; die beim nebennierenlosen Tier beschriebene (Bristol u. Drill) paradoxe Förderung der Wasserausscheidungsfähigkeit ist aber bei den hypophysenlosen Tieren weniger ausgeprägt. Die MD bei oraler Gabe von Wasser läßt sich bei hypophysenlosen Tieren durch Cortison (25 mg/kg/Tag s.c.) innerhalb von 5 Tagen und — im Gegensatz zu älteren Angaben — auch durch DOCA (20 mg/kg/Tag s.c.), allerdings erst innerhalb von 12 Tagen, annähernd normalisieren: längere Behandlung bringt keine weitere Steigerung. Akute Vorbehandlung mit 1 mal 50 mg/kg Cortison 2 Std vor der Wassergabe ist weniger wirksam als 5tägige Behandlung. Die mit N.N.R.H. behandelten hypophysenlosen Ratten unterscheiden sich von normalen Tieren wesentlich dadurch, daß die MD bei Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung ebenso groß wie bei Gabe von Wasser ist.

Bei normalen Ratten bewirkt 5tägige Behandlung mit Cortison oder DOCA in den gleichen Dosen eine etwa 10%ige signifikante Steigerung der MD nach Gabe von Wasser, nicht aber der MD nach Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung.

Die Natrium- und Chloridausscheidung hypophysektomierter Ratten im akuten Versuch ist gegenüber normalen Kontrolltieren nicht gesenkt. Die Behandlung mit Cortison und DOCA normalisiert bei den hypophysenlosen Ratten die Natriumausscheidung, während die Chloridausscheidung nicht in gleichem Maß gesteigert wird, hat aber keinen Einfluß auf Natrium- und Chloridausscheidung normaler Tiere. Die Kaliumausscheidung im Harn steigt bei normalen Tieren in Abhängigkeit von der Natriumausscheidung, wird bei hypophysenlosen Tieren jedoch vom Natriumgehalt des Harns nicht beeinflußt. DOCA und Cortison haben im akuten Versuch keinen Einfluß auf die Kaliumausscheidung.

DOCA und Cortison haben somit per se eine diuresebeschleunigende Wirkung. Beim hypophysenlosen Tier, dem anscheinend ebenso wie dem nebennierenlosen Tier die „Unterscheidungsfähigkeit" für Wasser und physiologischer NaCl-Lösung abgeht, erstreckt sich die diuresebeschleunigende Wirkung *beider* N.N.R.H. auch auf die Diurese nach „Wässerung mit 0,9%iger NaCl-Lösung.

Literatur

Bristol, W. R., and V. A. Drill: Endocrinology 58, 677 (1952).

K.-W. v. Eickstedt (Göttingen): Ein Beitrag zur Funktion gonadotroper Hormone

Von Guyénot wurde 1945 die Abtrennung einer follikelstimulierenden Komponente von dem luteinisierend wirkenden Anteil des Schwangerenharngonadotropins beschrieben. Die Trennung erfolgte durch Filterkerzen. Der follikelstimulierende Faktor wurde im Filtrat gewonnen. Drescher berichtete 1954 über die Abtrennung einer follikelstimulierenden Verbindung von der luteinisierenden des Choriongonadotropins durch Salzfällung sowie mit Hilfe der fermentativen Spaltung. Wettstein u. Benz gewannen durch fermentative Spaltung aus Choriongonadotropin einen hormonal wirksamen Anteil, welcher bei der Dialyse durch Cellophan wanderte und aus der Außenflüssigkeit der Dialysierschläuche heraus angereichert werden konnte.

Bei der Anwendung der Gorbmanschen Methode zur Anreicherung gonadotroper Hormone durch Ultrafiltration wurde in eigenen Versuchen im Ultrafiltrat von Choriongonadotropin eine follikelstimulierend wirkende Komponente festgestellt. Dieser follikelstimulierende Faktor betrug in der Regel nur einen geringen Anteil der gesamten gonadotropen Aktivität. Er wurde durch eiweißdichte Membranen aus Celluloseestern (Ultracellafilter) von dem luteinisierend wirkenden Anteil zusammen mit Steroidhormonen abgetrennt. Mit Hilfe der Methode von Bradbury, Brown u. Brown wurde die follikelstimulierende Komponente des Ultrafiltrats angereichert und von oestrogenen Substanzen getrennt. Das angereicherte Hormon bewirkte an den Ovarien infantiler Mäuse eine stärkere Follikelreifung als das nicht konzentrierte Hormon des Ultrafiltrats. Die mittleren Porendurchmesser der kolloidalen Membranen, durch welche die genannten follikelstimulierenden Substanzen gepreßt wurden, waren deutlich kleiner als 5 mμ (bestimmt nach Maier u. Beutelspacher). Somit mußte es sich bei diesen noch biologisch aktiven Verbindungen um niedermolekulare Stoffe handeln. Auf Grund der Untersuchungen von C. H. Li, welcher biologisch wirksame Pepsinhydrolysate aus Follikelstimulationshormon (FSH) herstellte, die bei der Dialyse durch Cellophan wanderten, darf der Schluß gezogen werden, daß die im Ultrafiltrat von Choriongonadotropin erhaltenen follikelstimulierend wirkenden Substanzen ebenfalls niedermolekulare Abbauprodukte dieses Proteohormons sind.

W. Kunz (Tübingen): Über die Membranwirkung von Steroiden

Nach früheren Untersuchungen hemmen Steroide in Konzentrationen von 10^{-6} aufwärts unabhängig von ihrem hormonalen Wirkungscharakter und ihrer biologischen Wirkungsstärke die Gewebsglykolyse. Bei der

Analyse dieses Effektes zeigte es sich, daß nur die Verwertung von Glucose, nicht dagegen der Abbau intracellulärer Glykolysesubstrate wie des Glykogens und der Hexosephosphate herabgesetzt wird. Damit übereinstimmend wurde die Glykolyse zellfreier Muskelextrakte erheblich weniger gesenkt als die Gärung intakter Muskelzellen. Beide Befunde machten wahrscheinlich, daß die Hemmung der Gewebsglykolyse ursächlich durch eine Beeinflussung der Glucosepermeation bedingt ist.

Zur Prüfung dieser Annahme wurde die Wirkung von 23 teils hormonal wirksamen, teils indifferenten Steroiden auf die Zellpermeabilität untersucht. Die Permeabilitätsmessungen wurden an Erythrocyten von Mensch, Rind, Schwein, Kaninchen und Ratte durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte in erster Linie mit Hilfe photometrischer Verfahren (Wilbrandt), zur Differenzierung wurden außerdem Zellzahl, freies Hämoglobin und Hämatokritwerte bestimmt.

Alle Steroide erhöhen die hämolytische Resistenz sämtlicher untersuchten Blutarten gegenüber hypotoner NaCl- und KCl-Lösung. Die Wirkung beginnt bei einer Konzentration von 10^{-6} und ist bei etwa $5 \cdot 10^{-5}$ maximal. Ein Vergleich der Wirkungsstärke der Derivate läßt keinen Zusammenhang mit deren biologischer Wirksamkeit, jedoch eine deutliche Abhängigkeit von den Löslichkeitseigenschaften der Substanzen erkennen. Die Wirkung ist am ausgeprägtesten bei Steroidverbindungen mit stark apolarem Charakter und vermindert sich mit zunehmender Polarität des Moleküls. So besitzt das biologisch indifferente, jedoch stark lipoidlösliche 2,3-Androstenon die stärkste Wirkung aller untersuchten Substanzen, während Oestradiol nur wenig wirksam ist. Entsprechend steigt die Wirksamkeit in der Reihe Androstendiol $<$ Methylandrostendiol $<$ Äthylandrostendiol mit Verlängerung der Seitenkette an. Acetat- und Benzoatverbindungen besitzen im Vergleich mit den freien Steroiden verstärkte Wirksamkeit, während die wasserlöslichen Glykoside und die Phosphatester unwirksam sind oder teilweise die Hämolyse gering fördern. Herzglykoside verhalten sich analog; Strophantidin erhöht die Resistenz, Strophantin wirkt im gleichen Konzentrationsbereich hämolysesteigernd.

Der Verlauf der photometrischen Kurven und die Hämatokritwerte zeigen übereinstimmend, daß Ausmaß und Geschwindigkeit der Zellschwellung und damit der Permeation von Wasser nicht beeinflußt werden. Als Ursache der Resistenzerhöhung muß eine Verschiebung der Hämolyseschwelle durch Stabilisierung der Membran angenommen werden.

Ebenso wie die Permeabilität für Wasser bleibt die Eintrittsgeschwindigkeit von Nichtelektrolyten mit mittlerem Molekularvolumen unverändert. Die Permeationsgeschwindigkeit größerer, wenig lipoidlöslicher Moleküle wird ebenfalls nicht vermindert, während sich bei gut lipoidlöslichen Substanzen mit großem Molekularvolumen, wahrscheinlich infolge teilweiser Besetzung der lipoiden Membranstellen durch die

Steroide, eine geringe Verzögerung feststellen läßt. Deutlich herabgesetzt wird dagegen die Permeation von Glucose. Die Aktivität der Derivate entspricht dabei etwa ihrer Wirksamkeit auf die Glykolyse. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die Hemmung der Glucosepermeation auf einer Beeinflussung der Fermentsysteme des aktiven Glucosetransportes beruht.

Literatur

Wilbrandt, W.: Pflügers Arch. **241**, 302 (1938).

E. Westermann (Frankfurt a. M.): Über den Einfluß von Thyroxin und Trijodthyronin auf die Aminoxydase- und Dopadecarboxylase-aktivität der Leber

Die bekannte Übererregbarkeit des sympathischen Nervensystems bei Überfunktion der Schilddrüse versuchte Burn mit einer Hemmung der *Aminoxydase* zu erklären, der für die Inaktivierung sympathicomimetischer Amine — also auch der Sympathicusstoffe Noradrenalin und Adrenalin — Bedeutung zukommt. Diese Hypothese fand eine Stütze in Versuchen an Kaninchen, in denen nach Behandlung mit Schilddrüsentrockenpulver die Aminoxydaseaktivität der Leber abnahm. Wir haben diesen Befund durch Versuche an Meerschweinchen und Ratten zu erweitern versucht und gleichzeitig den Einfluß des Thyroxins auf die Aktivität der *Dopadecarboxylase* — eines nichtoxydativen Fermentes — untersucht.

Die Tiere wurden 3—5 Tage lang mit Thyroxin bzw. Trijodthyronin (1 mg/kg s.c.) behandelt, am darauffolgenden Tag getötet und in Leberextrakten die Aktivität der Aminoxydase (mit Tyramin als Substrat) und der Dopadecarboxylase in der Warburg-Apparatur manometrisch bestimmt. Es zeigte sich, daß die *Aminoxydaseaktivität* bei den mit Schilddrüsenhormon behandelten Tieren ausnahmslos höher lag als bei den unbehandelten Kontrollen. Demgegenüber hatte die *Dopadecarboxylaseaktivität* in der Leber der mit Thyroxin behandelten Tiere abgenommen. Die Ergebnisse änderten sich nicht wesentlich, wenn man die Fermentaktivität anstatt auf Feuchtgewicht auf Trockengewicht oder Milligramm Stickstoff der Leber bezieht. Legt man der Berechnung aber das — ebenso wie das Körpergewicht — stark verminderte Lebergewicht zugrunde, so bleibt für die Aminoxydase nur eine nicht mehr signifikante Aktivitätssteigerung übrig, für die Dopadecarboxylase ergibt sich erst recht eine signifikante Abnahme der Aktivität. — Prinzipiell gleiche Ergebnisse hatten Versuche an Tieren, die 3—5 Tage lang gehungert hatten.

Die Befunde der englischen Autoren, daß die Aktivität der Aminoxydase in der Leber nach Schilddrüsenhormonbehandlung vermindert ist,

können wir somit nicht bestätigen. Wenn die Aminoxydase der Leber nach Behandlung mit Schilddrüsentrockenpulver, Thyroxin oder Trijodthyronin überhaupt eine Aktivitätsänderung erfährt, dann nur im Sinne einer *Zunahme*. Das würde damit im Einklang stehen, daß nach Klein die Aktivität eines anderen Oxydationsfermentes, der d-Aminosäurenoxydase, in der Leber thyreotoxischer Tiere vermehrt ist.

Die signifikante Abnahme der Dopadecarboxylase-Aktivität nach Thyroxin und im Hunger könnte sowohl durch einen Mangel an *Coferment* als auch durch einen Verlust an *Apoferment* bedingt sein. Setzt man den Leberextrakten das Coferment der Dopadecarboxylase — Pyridoxalphosphat — zu, so läßt sich das Ferment bei den *Normaltieren* um fast 100% aktivieren. Die Dopadecarboxylase der *hungernden* Tiere wird durch Pyridoxalphosphat so stark aktiviert, daß sie die Werte der pyridoxal-haltigen Kontrollansätze erreicht. Demgegenüber wird das Ferment bei den *thyreotoxischen* Tieren durch Coferment kaum aktiviert.

Im *Hungerzustand* scheint es demnach vor allem ein Mangel an *Coferment* zu sein, der zu einer Aktivitätsminderung der Dopadecarboxylase führt, im *thyreotoxischen* Zustand dagegen auch ein Verlust an *Apoferment*.

Literatur

Klein, J. R.: J. of Biol. Chem. **128**, 659 (1939). — Spinks, A., and J. H. Burn: Brit. J. Pharmacol. **7**, 93 (1952).

Diskussion. Stürmer (Berlin-Lichterfelde): Frage, ob das umgekehrte Experiment durchgeführt worden ist: Bestimmung der Oxydaseaktivität nach Thyreoidektomie. Burn und Mitarbeiter haben bei dieser Versuchsanordnung eine Steigerung der Amino-Oxydaseaktivität gefunden.

Schlußwort. Westermann: In Versuchen an Meerschweinchen ließ sich drei Wochen nach Thyreoidektomie keine Änderung der Aminoxydaseaktivität in der Leber nachweisen.

E. Muscholl (Mainz): Das intracellulär gemessene Membranpotential des Rattenzwerchfells unter der Einwirkung thiolopriver Substanzen

Das Membranpotential (MP) einzelner Fasern des isolierten Rattenzwerchfells wurde mit Hilfe 3 M KCl-gefüllter Mikroelektroden nach Ling u. Gerard gemessen. Zur Anpassung an den Gleichspannungsverstärker des zur Registrierung benutzten Oszillographen diente eine Kathodenfolgerstufe nach Nastuk u. Hodgkin. Das in Tyrodelösung (mit 95% O_2 + 5% CO_2 gesättigt) bei 22—24° C aufgespannte Zwerchfell wies ein MP von $87{,}3 \pm 0{,}31$[1] mV auf (539 Fasern). Die Häufigkeitsverteilung ergibt eine asymmetrische Kurve mit steilem Abfall bei den hohen MP-Werten. Wie gleichzeitiges Ausmessen der Muskelfasern mit

[1] Mittlerer Fehler des Mittelwertes = $s_{\bar{x}}$.

Okularmikrometer zeigte, nahm das MP mit der Faserdicke geringfügig zu.

Zusatz von 1 mM/L Oxarsan (m-Amino-p-oxyphenylarsen(III)-oxyd) führte nach 2 Std zu einem Abfall des MP auf 80 mV und nach 4 Std auf 55 mV. Die Kontraktur des Muskels war nach 4 Std bereits vollständig. Erst im Verlauf von 6 und mehr Stunden schritt die Depolarisation auf 10—20 mV fort. Ähnliche Befunde wurden mit 2,7 mM/L Monojodacetat erhoben. Dagegen ging der MP-Abfall, der durch 1 mM/L Salyrgan (3-Oxymercuri-2-methoxy-propylamid des Salicylsäureglykolsäureäthers) oder durch 0,2—1 mM/L Kupferglykokoll hervorgerufen wurde, der Verkürzung des Muskels zeitlich parallel (MP nach 25 bis 50 min 16—30 mV; die Kontraktur in 30—50 min vollständig). Unter dem Einfluß von Salyrgan trat eine gesteigerte Erregbarkeit des Muskels auf: a) wurden Fibrillationen mit fortgeleiteten Aktionspotentialen („overshoot" 20—30 mV) und b) bei Einstich der Elektrode auslösbare lokale Erregungen beobachtet, die in 5—40 aufeinanderfolgenden, schnellen Depolarisationen (ohne „overshoot") bestanden.

Literatur

Ling, G., and R. W. Gerard: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **34**, 413 (1949). — Nastuk, W. L., and A. L. Hodgkin: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **35**, 39 (1950).

I. Satke-Eichler und Chr. Stumpf (Wien): Verzögerte Krampfwirkung hoher Insulindosen bei normalen und adrenalektomierten Mäusen

Mit 1 Textabbildung

Schon Marks hat vor mehr als 20 Jahren darauf hingewiesen, daß man bei einer Insulinstandardisierung über eine Dosis von 0,75 iE/kg Tiergewicht nicht hinausgehen solle. Er und andere Autoren konnten zeigen, daß bei Überschreitung dieser Dosis der hypoglykämische Effekt bei Kaninchen nicht mehr gesteigert werden kann. In jüngster Zeit konnte Mohnike in umfangreichen Untersuchungen an Kaninchen nachweisen, daß bei intravenöser Verabreichung relativ hoher Insulindosen die hypoglykämische Reaktion nicht nur keine Steigerung, sondern sogar eine Verzögerung erfuhr. Bei einigen Tieren trat nach intravenöser Verabreichung von 240 iE Insulin die Blutzuckersenkung später ein als nach Gaben von etwa 0,5—1,0 iE.

Bei dem Versuch, das alternative, bei Verwendung einer mäßigen Tierzahl relativ ungenaue Standardisierungsverfahren für Insulin am Mäusekrampftest in eine quantitatives zu verwandeln, konnten wir eine mit den Befunden Mohnikes übereinstimmende Beobachtung machen. Wählt man anstelle des Wirkungskriteriums „Krampf" oder „kein

Krampf" die bei den einzelnen Tieren von der Injektion bis zum Krampfeintritt verstrichene Latenzzeit, so ergibt sich eine etwas unerwartete Dosis-Wirkungsbeziehung.

In unseren Versuchen an inzuchtreinen Albinomäusen wurden Dosen von 0,0128—40 iE/10 g Tiergew. verabfolgt, der logarithmische Dosenabstand betrug jeweils 0,699. Im übrigen wurden die von Emmens für die Insulinauswertung vorgeschriebenen Versuchsbedingungen eingehalten.

Trägt man nun die bei den einzelnen Dosen gefundenen mittleren Latenzzeiten bis zum Krampfeintritt auf der Ordinate, die Dosen in logarithmischen Abständen auf der Abszisse auf, so erhält man eine Parabel. Bei dieser liegt die kürzeste Latenzzeit bei einer Dosis von 1,6 iE/10 g Tiergew. Erwartungsgemäß findet man zwar im ersten Abschnitt der Kurve zwischen Dosis und Latenzzeit eine negative Korrelation, hingegen nimmt die Latenzzeit nach Überschreiten der Dosis von 1,6 iE mit steigender Insulingabe wieder zu.

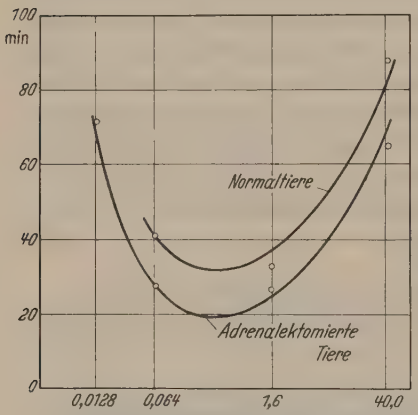


Abb. 1. Krampfeintritt nach I. E. Insulin mg/10 g Maus: Mittlere Latenzzeiten

Mohnike hat vermutet, daß die bei Kaninchen nach hohen Insulindosen häufig auftretende Verzögerung der hypoglykämischen Reaktion auf gegenregulatorische Mechanismen zurückzuführen ist. Bei diesen soll die Nebenniere maßgebend beteiligt sein. Diese Annahme wäre mit den Ergebnissen von Schümann und Froesch gut in Übereinstimmung zu bringen. Schümann konnte nachweisen, daß die Nebennieren nach Verabreichung großer Insulindosen extrem an Adrenalin verarmen, nach Froesch zeigen die Glucocorticoide im Serum nach Insulingabe einen deutlichen Anstieg. Auch dieser Autor mißt der Nebenniere im Rahmen der Insulingegenregulation die größte Bedeutung zu.

Auf Grund dieser Befunde war es naheliegend, die Untersuchung der Dosis-Latenzzeit-Beziehung mit gleicher Methodik an adrenalektomierten Tieren durchzuführen. Die Insulininjektion erfolgte bei diesen Versuchen 24 Std nach Entfernung der Nebennieren. Nach dieser Zeit spielt eventuell vorhandenes akzessorisches Nebennierengewebe noch keine wesentliche Rolle. Die kleinste Dosis betrug hier nur 0,00256 iE/10 g Tiergew.

Es zeigte sich nach der Adrenalektomie die erwartete, signifikante Steigerung der Insulinempfindlichkeit. Die Dosis von 0,00256 iE, welche

bei normalen Mäusen nicht mehr krampfauslösend wirkte, vermochte bei adrenalektomierten Tieren Krämpfe hervorzurufen. Die mittleren Latenzzeiten bis zum Krampfeintritt waren in allen Fällen nach Entfernung der Nebennieren um die praktisch gleiche Zeit von 10—13 min verkürzt. Der Verlauf der Dosis—Wirkung—Beziehung war durch die Adrenalektomie nicht verändert worden. Bei graphischer Darstellung ergibt sich hiermit eine parabelförmig verlaufende Kurve, die gegenüber der Kurve der Normaltiere nur in der Ordinatenachse parallel verschoben erscheint.

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Verlängerung der Latenzzeiten bis zum Krampfeintritt nach extrem hohen Insulindosen nicht auf eine verstärkte Gegenregulation von seiten der Nebenniere bezogen werden kann.

Literatur

Emmens, C. W.: Hormone Assay. Academic Press, N. Y. 1950. — Froesch, R.: Schweiz. med. Wschr. **85**, 121 (1955). — Marks, H. P.: Quart. J. Pharmacy **5**, 255 (1932). — Mohnike, G.: Beiträge zum Insulin-Glukagon-Problem, Teil I, Leipzig: G. Thieme 1953. — Schümann, H. J.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 164 (1949).

J. D. Achelis, E. Haack und K. Hardebeck (Mannheim): Über neue blutzuckersenkende Substanzen

Bei der klinischen Erprobung eines neuen Sulfonamids haben sich Hinweise ergeben, daß diese Substanz neben guter chemotherapeutischer Wirksamkeit eine nicht sehr ausgeprägte, aber doch deutliche Wirkung auf den Nüchternblutzucker des Menschen haben kann.

Es wird zunächst über die chemotherapeutische Verwendbarkeit des Sulfonamids, das zu den substituierten Sulfanilylharnstoffen gehört, berichtet. Die Substanz ist auch in ihrer acetylierter Form und bei leicht saurem p_H sehr gut löslich. Im Warburg-Versuch läßt sich gegenüber verschiedenen Keimarten eine echte Bakteriostase nachweisen, die schon bei niedrigerer Konzentration eintritt als bei dem zum Vergleich herangezogenen heterocyclischen Sulfonamid. Am Menschen halten die Blutspiegel nach einer einmaligen Dosis auffallend lang an (Abfall in 24 Std 20% des Maximums). Bei der Aronsonsepsis der Maus genügt eine Tagesdosis von 1,0 mg für eine gute chemotherapeutische Wirkung, während vom Vergleichssulfonamid 20 mg gebraucht werden. Diese hohe chemotherapeutische Wirksamkeit im Tierversuch erklärt sich zum erheblichen Teil aus den langanhaltenden Blutspiegeln.

Es wird dann der Effekt auf den Blutzucker am Menschen, Hund und Kaninchen demonstriert. Die Schwellendosen liegen bei 2 g i.v. beim Menschen 0,1 g/kg Hund bzw. 0,25 g/kg i.v. beim Kaninchen. Es ergeben sich mehrere Stunden anhaltende Senkungen des Blutzuckers um

30—40%, also bis an die untere Grenze der Norm. Beim Kaninchen führen hohe i.v. Dosen nicht mehr zu einer Hypoglykämie, sondern zu einer deutlichen Hyperglykämie, die bei oraler Applikation erst bei extrem hohen Dosen (4 g/kg) zu beobachten ist.

Der Blutzuckereffekt ist reversibel und läßt sich an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen wiederholen. Dabei ist in einigen Versuchen ein leichter kumulativer Effekt angedeutet. Akute hypoglykämische Zustände sind selten. Sie lassen sich durch Glucosezufuhr sicher beherrschen.

Die Befunde an alloxandiabetischen Kaninchen sind noch nicht eindeutig. Etwa 50% der Tiere reagiert mit deutlichen, mehrere Stunden anhaltenden Blutzuckersenkungen, die dann wieder von einem Anstieg gefolgt sind. Der Versuch läßt sich mehrfach am gleichen Tier wiederholen. Die Senkungen betragen etwa 50% des alloxandiabetischen Blutzuckerniveaus. In 3 Fällen blieb BZ 55 beim Alloxandiabetes wirkungslos. Vielleicht wurde der Zustand der Tiere sogar verschlechtert.

Abschließend werden aus der umfangreichen klinischen Erprobung 2 Beispiele demonstriert. Im ersten Fall kann man erhebliche Insulinmengen von einem Tag zum anderen streichen und durch BZ 55 ersetzen. Nach diesem Typ verlaufen etwa 70% der bisher untersuchten Diabetesfälle. In einem Fall von jugendlichem Diabetes blieben auch sehr hohe Dosen BZ 55 wirkungslos, während die anschließende Insulinbehandlung zur vollen Kompensation führte.

Diskussion. Bänder (Höchst): Seit längerer Zeit haben wir uns mit ähnlichen Substanzen beschäftigt und können die Ergebnisse von Achelis in bezug auf Tier und Mensch vollauf bestätigen. Auch am Hund sind die gleichen Blutzuckerreaktionen zu erhalten.

Ferner (Hamburg): Nach einmaliger Verabreichung einer massiven Dosis der in Frage stehenden Substanz an Kaninchen und Ratten fördert die mikroskopische Untersuchung der Langerhansschen Inseln eine Einwirkung auf das A-Zellensystem des Inselapparates zutage. Die A-Zellen als Quelle des 2. Inselhormons sind im Sinne des Schollen- und Blasenstadiums geschädigt. Die verschiedenen Zustandsbilder der B-Zellen entsprechen in allen Fällen funktionellen Phasen. Morphologisch wurde eine Schädigung der B-Zellen in keinem Falle beobachtet. Trotz hoher Dosierung bis zu 3 g/kg oral bzw. intraperitoneal konnten histologisch keine Schädigungen der Leber und der Nieren gesehen werden.

Kühn (Berlin, Humboldt-Univ.): Sulfanilisopropylharnstoff hat bei Patienten — zum Zwecke der Chemotherapie gegeben — Zustände ausgelöst, die einer Hypoglykämie ähnlich und durch Traubenzuckerinjektionen beeinflußbar waren. Die LD 50 dieser Substanz beträgt bei der Maus s.c. 4,7 g/kg, oral 6,5 g/kg. Kaninchen, die 5 g pro die mehrere Tage lang bis insgesamt 74 g/kg erhielten, zeigten erhöhte Insulin-Empfindlichkeit.

Nach zweimaliger Zufuhr von 3—5 g/kg an 2 aufeinanderfolgenden Tagen war der Blutzuckerspiegel deutlich erniedrigt. Gleichzeitig wiesen die Tiere eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cardiazol auf. Bemühungen um die Klärung des Angriffspunktes unter Einbeziehung von Adrenalin, Insulin, Pentamethylentetrazol

und Glucosebelastung brachten keinen Erfolg. Schon vor 3 Jahren wurde im Rahmen der Pharmakologischen Gesellschaft über die Beeinflussung des Leberglykogens bei Ratten durch diese Substanz und eine Reihe verwandter Derivate berichtet. Zum Teil wurde eine Steigerung des Leberglykogengehaltes beobachtet, am stärksten bei Sulfanilyl-n-butylharnstoff.

Peters (Mainz): In den Kriegsjahren fand A. Loubatières in Montpellier eine blutzuckersenkende Wirkung eines anderen Sulfonamids, des p-Amino-benzolsulfonamido-isopropyl-thiadiazols, auf ganz ähnliche Weise wie der Vortragende (C. r. Soc. Biol. (Paris) **138**, 766, 830, 1944). Untersuchungen von J. La Barre u. J. Reuse (Arch. internat. Physiol. **54**, 58, 1946). Arch. néerl. Physiol. **28**, 475, 1947) zeigten, daß das Mittel bei pankreatektomierten Tieren — und auch bei Alloxan-Diabetes — wirkungslos war und keine antagonistische Wirkung gegen Hypophysenvorderlappen-Extrakte aufwies. Daraus wurde gefolgert, daß das Präparat lediglich die Insulinausschüttung aus dem Inselapparat steigert. Es fand daher keinen Eingang in die Therapie.

Blutzuckersenkende Wirkungen sind bei einer ganzen Reihe von Pharmaka beschrieben worden. Ein Mittel, das in der Diabetes-Therapie verwandt werden soll, muß aber auf den Intermediärstoffwechsel insulinartig wirken und nicht nur den Blutzucker — durch Beeinflussung der Leber, der A-Zellen des Pankreas oder Beschleunigung der Insulinausschüttung — senken. Als wichtigstes Kriterium der Wirksamkeit ist eine eindeutige Beeinflussung des Diabetes pankreatektomierter Tiere zu fordern, da auch beim alloxandiabetischen Tier die genannten Faktoren noch eine Rolle spielen könnten.

Die vom Vortragenden geschilderten klinischen Fälle beweisen nicht eindeutig die Wirksamkeit des neuen Pharmakons beim menschlichen Diabetes. In leichteren Fällen oder bei vorübergehenden Verschlechterungen der Stoffwechsellage gelingt es nach kürzerer oder längerer Insulinbehandlung oft, die Insulindosis wesentlich zu reduzieren oder ganz abzubauen, ohne daß der Blutzucker wieder ansteigt.

Zur Harmlosigkeit des neuen Mittels sei bemerkt, daß die Toxizität des chemisch — und vielleicht auch im Wirkungsmechanismus — ganz anders gearteten Synthalin einem so aufmerksamen und sorgfältigen klinischen Beobachter wie E. Frank erst auffiel, nachdem eine größere Zahl von Diabetikern längere Zeit damit behandelt worden war.

Orzechowski (Schleswig): Beim Altersdiabetes sahen wir eine deutliche Insulin-sparende Wirkung. Im Auslaßversuch stieg der Insulinbedarf wieder auf den Ausgangswert an. Beim jugendlichen Diabetes wurde einmal eine paradoxe Wirkung beobachtet mit Anstieg der Blutzuckerwerte und der Harnzuckerausscheidung, die nach Absetzen der Substanz rasch wieder verschwand.

Schlußwort. Achelis zu Kühn: Das Leberglykogen ist auch nach chronischer Zufuhr sicher nicht herabgesetzt.

Zu Ferner: Die histologischen Befunde scheinen mir noch einmal zu unterstreichen, daß der Mechanismus der Blutzuckersenkung sich vom Insulinmechanismus grundsätzlich unterscheidet.

Zu Peters: Dank für die historischen Anmerkungen. — Insulin wurde in unseren Versuchen nicht allmählich, sondern abrupt von einem Tag zum anderen entzogen.

Zu Bänder: Es bestehen weitgehende Übereinstimmungen zwischen den Versuchen in Höchst und in Mannheim. Wir freuen uns besonders, dies feststellen zu können, da Höchst und Boehringer, Mannheim, das ganze Gebiet in Zukunft gemeinsam bearbeiten werden.

W. Leppla und C. v. Holt (Hamburg): Blutzuckersenkende Peptide aus Blighia sapida

Seit der Entdeckung des Insulins haben blutzuckersenkende Substanzen von nicht hormonalem Charakter immer wieder das Interesse der theoretischen und praktischen Medizin beansprucht. So wurde in den letzten 30 Jahren über blutzuckersenkende Wirkungen von Extrakten aus zahlreichen Pflanzen und Mikroorganismen berichtet und deren therapeutische Nutzbarmachung versucht; jedoch sind dabei chemisch definierte Substanzen als Träger derartiger Wirkungen meist nicht gefaßt worden[5].

Neuere Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus synthetischer blutzuckersenkender Stoffe vom Typus des Decamethylendiguanidins und einer Reihe von Thiodiazolderivaten haben gezeigt, daß deren hypoglykämisierende Eigenschaft auf einer endokrinotropen Wirkung beruht[4]. Es kommt durch diese Substanzen zu einer Schädigung bzw. zu einer Zerstörung der A-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas, in denen das blutzuckersteigernde Hormon Glucagon gebildet wird.

In Fortführung unserer Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus blutzuckersenkender Substanzen haben wir uns mit den von Hassall u. Mitarb.[1, 2] entdeckten Hypoglycinen, zwei Stoffen von Peptidcharakter aus der in Jamaica heimischen Blighia sapida beschäftigt. Hypoglycin A wird für die in Jamaica nach dem Genuß unreifer Ackeefrüchte beobachteten Hypoglykämien verantwortlich gemacht. Dieses Peptid Hypoglycin A haben wir in guter Ausbeute unter Anwendung von Ionenaustauscherchromatographie und Gegenstromverteilung aus unreifen Ackeefrüchten als kristalline, chromatographisch einheitliche Substanz isoliert[3]. Die Substanz bewirkt bei oraler Gabe in Dosen von 4—5 mg/100 g an nüchternen Ratten eine tiefe Hypoglykämie mit letalem Ausgang bei fast vollständigem Schwund des Leberglykogens.

Untersuchungen über die Zusammensetzung des Hypoglycins A sind noch nicht zum Abschluß gekommen. Bei der Hydrolyse wird Hypoglycin in ein Gemisch verschiedener mit Ninhydrin färbbarer Substanzen aufgespalten, von denen besonders eine mit Ninhydrin gelb gefärbte Verbindung auffällt, welche nicht mit Prolin oder Oxyprolin identisch ist.

Die biologische Aktivität des Hypoglycins A scheint nicht ausschließlich an die intakte Peptidstruktur gebunden zu sein, da bei Hydrolyse der Substanz in 10 n HCl über 6 Std bei 110° C kein vollständiger Verlust der biologischen Wirkung eintritt. Das ursprüngliche Peptid ist nach dieser Behandlung nicht mehr nachweisbar. Es wird gegenwärtig versucht, die

noch verbliebene Aktivität einer bestimmten Fraktion des Hydrolysates zuzuordnen.

Zusammenfassend kann nach den bisherigen Ergebnissen als hervorstechendste biologische Eigenschaft des Hypoglycins A seine starke blutzuckersenkende Wirkung betrachtet werden. Diese Wirkung auf den Blutzucker verläuft unabhängig von der Anwesenheit der Nebennieren. Eine für normale und adrenalektomierte Tiere letale Dosis wird von alloxandiabetischen Tieren bei wesentlich geringerem prozentualem Blutzuckerabfall toleriert. Bei alloxandiabetischen Tieren führt die über mehrere Tage wiederholte Zufuhr eines Zehntels der für normale Tiere letalen Dosis zu einem erheblichen Rückgang der Glykosurie und des Harnvolumens.

Da die Glykogenolyse von Leberschnitten in vitro durch Hypoglycin A nicht beeinflußt wird, läßt sich der am intakten Tier zu beobachtende Schwund des Leberglykogens und die damit einhergehende Blutzuckersenkung nicht auf einen unmittelbaren Angriffspunkt des Hypoglycins A in der Leber, etwa im Sinne einer Aktivierung ihres Phosphorylasesystems, zurückführen. Eine Förderung der Glykogensynthese im Rattendiaphragma, wie sie für das Insulin charakteristisch ist, hat sich in unseren bisherigen Untersuchungen signifikant nicht nachweisen lassen, so daß eine unmittelbar insulinimitierende Wirkungsweise des Hypoglycins A nach den vorliegenden Ergebnissen nicht wahrscheinlich ist. Die histologisch nachgewiesene Unversehrtheit der A-Zellen der Langerhansschen Inseln normaler wie auch alloxandiabetischer Ratten schließt eine Zerstörung dieser Zellen durch Hypoglycin A als mögliche Ursache der beobachteten Hypoglykämien aus.

Die unterschiedliche Aktivität der Substanz bei normalen und bei alloxandiabetischen Tieren könnte durch den unterschiedlichen Glykogengehalt der Leber unter diesen Stoffwechselbedingungen zu erklären sein; sie deutet aber auch auf die Möglichkeit hin, daß Hypoglycin A seine Wirkung in Abhängigkeit vom Funktionszustand des B-Zellsystems entfalten könnte, wobei eine von Randle[6] auch bei alloxandiabetischen Tieren nachgewiesene Insulininkretion zu berücksichtigen wäre. Der Wirkungsweise der Substanz sollen weitere Untersuchungen gelten.

Literatur

[1] Hassall, C. H., and K. Reyle: Biochemic. J. **60**, 334 (1955). — [2] Hassall, C. H., K. Reyle and P. Feng: Nature (Lond.) **173**, 356 (1954). — [3] Holt, C. v., u. W. Leppla: 3. Internat. Kongreß für Biochemie, Brüssel 1955. — [4] Holt, C. v., L. v. Holt, B. Kröner u. J. Kühnau: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 66 (1955). — [5] Lewis, J. J.: Physiologic. Rev. **29**, 75 (1949). — [6] Randle, P. J. in: The Hypophyseal Growth Hormone, 1955, McGraw-Hill, New York, Toronto, London, p. 413.

W. Schaumann (London): Zum Angriffspunkt der Wirkung von Morphium auf den Meerschweinchendünndarm

Morphium und andere Analgetica haben eine lähmende Wirkung auf die Vorbereitungs- und Entleerungsphase der Peristaltik, die ihrer Wirksamkeit als Analgetica parallel geht. Morphium lähmt auch Nicotin-Kontraktionen, und zwar in derselben Dosierung wie die Peristaltik. Ganglienzellen spielen bei der Entleerungsphase und bei der Nicotin-Kontraktion eine Rolle, doch kommt die Vorbereitungsphase auch ohne Mitwirkung von Ganglienzellen zustande. Daher kann die Wirkung von Morphium auf den Meerschweinchendünndarm nicht durch Lähmung der Ganglienzellen erklärt werden. Untersuchungen von Kosterlitz u. Mitarb. bestätigten die Ansicht von O. Schaumann u. Mitarb., daß die Vorbereitungsphase nicht rein muskulär bedingt ist, sondern durch einen nervös gesteuerten Reflex zustande kommt, der durch Dehnung der Ringmuskulatur ausgelöst wird. Der Angriffspunkt der Wirkung von Morphium ist an den nervösen Elementen zu suchen, die diesen Reflex übertragen.

Diskussion. Soehring (Hamburg): Anfrage, ob der Vortragende sichere Beweise, insbesondere histologische Befunde, für eine Schädigung der Ganglienzellen durch Kühlung hat. In analogen Versuchen an der Tänie des Meerschweinchens (Stave) ist diese Sicherung bisher nicht gelungen.

Schlußwort. Schaumann: McKenzie konnte histologische Schädigungen der Ganglienzellen nachweisen, wenn ein Darmstück 24 Std lang in der Kälte aufbewahrt wurde.

S. Wende (Berlin-Dahlem) und O. Schrappe (Hamburg): Pharmakologische Alkaloidsucht-Diagnostik mit Hilfe eines Opiatantagonisten

Nach Eddy, Fraser, Isbell u. Mitarb. führt eine subcutane Injektion von N-Allyl-normorphin innerhalb weniger Minuten zu einem „akuten Abstinenz-Syndrom", wenn das Mittel Süchtigen gegeben wird, die mehrere Wochen lang unter der Wirkung ausreichender Mengen von Morphin oder anderen Sucht-bildenden Opiaten standen. Hierauf aufbauend haben sie einen diagnostischen Test entwickelt, der ihrer Meinung nach bei Suchtverdacht die Feststellung erlaubt, ob bei dem Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung eine „physical dependence" von den oben erwähnten Substanzen besteht.

Wir haben gleichartige Untersuchungen mit dem Opiatantagonisten (-)-3-Oxy-N-allyl-morphinantartrat (Ro 1-7700)[1] begonnen. Auch unser „Allyl-Test" besteht darin, daß bis zu 3 subcutane Injektionen ansteigender kleiner Mengen des Antagonisten in Abständen von etwa 20 min

[1] Hoffmann-La Roche AG.

gegeben werden. Tritt schon vor der 2. oder 3. Einspritzung ein „Abstinenz-Syndrom" auf, so wird der Test abgebrochen. Das Abstinenz-Syndrom ist charakterisiert durch klinische Erscheinungen, wie sie bei einer Alkaloidsucht nach Absetzen des Suchtmittels beobachtet werden können. Wir sahen Blutdruckschwankungen und Veränderungen der Pulsfrequenz, Mydriasis, Hitzegefühl, Schweißausbruch, Polyurie, Frieren, cerebrales Gähnen und Hustenparoxysmen, Übelkeit und Erbrechen, ziehende Gliederschmerzen, motorische Unruhe, Gereiztheit, Bewußtseinstrübung, Desorientiertheit und sogar kurzdauernde delirante Episoden.

Wie bei der klinischen Entziehung sind diese durch das Allyl-Derivat provozierten Entziehungserscheinungen nicht immer in gleicher Vollständigkeit und Stärke zu beobachten. Vereinzelt gibt es Süchtige, die diesen Antagonisten weitgehend tolerieren, ebenso wie Süchtige bekannt sind, bei denen die klinische Entziehung ohne ausgeprägte Entziehungserscheinungen vor sich geht.

Außerdem haben wir „chronische Morphinkranke" (nach P. O. Wolff) untersucht, d. h. Kranke mit andauernden heftigen Schmerzzuständen, die deswegen mit Opiaten behandelt werden mußten. Bei diesen fiel der Allyl-Test „positiv" aus, obwohl sie nicht die Persönlichkeitsstruktur eines Süchtigen zeigten.

Als Erklärung hierfür dient uns vorerst die theoretische Vorstellung, daß der positive Ausfall des Allyl-Tests nur eine aktuelle „physical dependence" an ein natürliches oder synthetisches Morphinpräparat anzeigt. Die Diagnose einer Alkaloid-*Sucht* muß jedoch nach wie vor psychopathologisch fundiert sein. Die bisherigen Untersuchungen gestatten noch keinen Einblick in die pathophysiologischen Vorgänge, die dem positiven Testausfall zugrunde liegen. Auch ist das Untersuchungsmaterial nicht umfassend genug, um über weitere Einzelheiten berichten zu können. Zum Beispiel wurden in einzelnen Fällen anscheinend „paradoxe" Reaktionen beobachtet, die bisher nicht erklärt werden können. Genauere Untersuchungen sind im Gange.

G. Kroneberg (Mannheim-Waldhof), K. Graf (Marburg) und W. Overbeck (Göttingen): Kombinationswirkungen der Rauwolfia-Alkaloide Reserpin und Raubasin

Das in verschiedenen Rauwolfia-Arten enthaltene Alkaloid *Reserpin* hat neben sedativen Eigenschaften einen hemmenden Einfluß auf die zentrale Kreislaufregulation, der vor allem die sympathischen Anteile betrifft und in einer verminderten Ansprechbarkeit blutdrucksteigernder Reflexe zum Ausdruck kommt.

Damit geht zwangsläufig eine Hemmung der pressorischen Regulierfähigkeit des Kreislaufs einher, wodurch auch die Voraussetzungen für die Wirkung anderer blutdrucksenkender Pharmaka verändert werden.

Zur näheren Kennzeichnung dieser Verhältnisse wurden Kombinationsversuche an Hunden in Morphin-Chloralose mit *Reserpin* und dem ebenfalls in der Rauwolfia enthaltenen Alkaloid *Raubasin* (Achelis u. Kroneberg; Kroneberg u. Achelis) durchgeführt. Registriert wurden 1. der Femoralisdruck und die Herzfrequenz mit einem Statham-Element oder einem photoelektrischen Druckelement der Fa. Schwarzer, 2. das Durchströmungsvolumen der A. femoralis mit einem Shipley-Rotameter.

Am unbeeinflußten Tier führt eine Dauerinfusion von kleineren Raubasindosen innerhalb von 10—20 min zu einem geringen Abfall des systolischen und einem etwas stärkeren Abfall des diastolischen Druckes, zu einem Anstieg der Extremitätendurchblutung und zu einer Zunahme der Herzfrequenz.

1½ Std nach 0,2 mg/kg Reserpin i.v. ist der Blutdruck meistens etwas abgesunken, die Extremitätendurchblutung vermindert und die Herzfrequenz erniedrigt. Infundiert man jetzt dem unter Reserpin stehenden Tier die gleiche, *vor* Reserpin am Blutdruck nur schwach wirksame Raubasindosis, so kommt es *nach* Reserpin zu einem stärkeren Blutdruckabfall, der zunächst mit einer vermehrten und mit zunehmender Drucksenkung dann absinkenden Extremitätendurchblutung einhergeht.

In gleicher Weise führt eine vor Reserpin blutdruckunwirksame, aber durchblutungssteigernde Raubasindosis unter Reserpin zu einer Blutdrucksenkung. Die Ursache liegt wahrscheinlich in einer durch Reserpin verminderten Fähigkeit des Kreislaufs, trotz einer Gefäßerweiterung den arteriellen Mitteldruck konstant zu halten.

Für die Kombinationswirkung sind wahrscheinlich auch einige besondere Eigenschaften des *Raubasins* wichtig, denn außer der bekannten adrenergisch blockierenden Wirkung ließen sich noch *zentrale Wirkungen* differenzieren.

An der decerebrierten Katze findet man nach Raubasindosen, die am Blutdruck nur eine kurze Abschwächung der Arterenolwirkung auslösen, eine länger anhaltende Hemmung des *homolateralen Beugereflexes*. Diese Wirkung, die auch beim Yohimbin ausgeprägt ist, steht in keinem Zusammenhang mit der sympathicolytischen Wirkungsstärke, denn das gleichfalls zu den Yohimbinkörpern gehörende, aber sympathicolytisch mehrfach stärkere *Diacetylcorynanthin* bewirkt bei gleichen Dosen eine viel stärkere Abschwächung der Arterenolwirkung am Blutdruck, aber keine Hemmung des Beugereflexes. Auch die durch *Strychnin* oder *Nicotin* ausgelösten Reflexsteigerungen können durch Raubasin gehemmt werden.

Derartige Erregbarkeitsherabsetzungen finden sich nicht nur im cerbrospinalen, sondern auch im vegetativen Nervensystem, wie sich in Blutdruckversuchen nachweisen ließ. Mit *Nicotin* lassen sich bei intra-

aortaler Injektion (Einführung eines kleinen Katheters in die A. mesenterica sup. bis in die Aorta) an der *decerebrierten* und *adrenalektomierten Katze* stärkere Blutdrucksteigerungen auslösen. Die gleichen Nicotindosen sind intravenös praktisch unwirksam. Die Nicotinwirkung kann durch kleine Dosen von *Hexamethonium* ausgelöscht werden. Vergleicht man Nicotin und Arterenol in äquivalenten Dosen, so wird die Nicotinwirkung nach Raubasin i.v. deutlich stärker abgeschwächt als die Wirkung von Arterenol. Erst bei weiterer Steigerung der Dosierung werden beide gehemmt. So scheint also die *nicotinhemmende, ganglionäre Komponente des Raubasins* schon in niedrigeren Dosen als die adrenergisch blockierende wirksam zu werden.

Raubasin besitzt somit nicht nur blockierende Wirkungen an den sympathischen Nervenendigungen, sondern setzt zusätzlich die Erregbarkeit der vorgeschalteten Ganglienzellen herab, so daß bei einer Kombination mit Reserpin sowohl die Kreislaufzentren, wie auch die verschiedenen peripherer gelegenen Anteile der sympathischen Gefäßinnervation erfaßt werden.

Literatur

Achelis, J. D., u. G. Kroneberg: Naturwissenschaften **40**, 625 (1953). — Kroneberg, G., u. J. D. Achelis: Arzneimittel-Forsch. **4**, 270 (1954).

M. L. Chatterjee (Calcutta) und H. F. Häusler (Graz): Über periphere „Anti"-Wirkungen von Rauwolfia serpentina Benth. (R. S.)

Folgende Befunde wurden mit einem 2% HCl-Total-Extrakt erhoben:

An atropinisierten, chloralosenarkotisierten bzw. Spinalkatzen mit und ohne Abbindung der Nebennierengefäße wurde eine Anti-*Nicotin*-Wirkung von R.S. gefunden, welche größer war gegen die nicotinartige Acetylcholinwirkung als gegen die Wirkung von Nicotin (oder Adrenalin) auf den Blutdruck; dabei trat noch eine prompte Reaktion auf Substanzen mit Glattmuskelwirkung wie etwa HHL-Extrakte ein.

Zusätzlich wurden Untersuchungen an *isolierten* Organen unternommen: An Kaninchenaurikeln, wo R.S. eine Frequenz- und Amplituden-Verminderung hervorruft, wurden diese beiden unter *Adrenalin* gesteigerten Herzqualitäten durch R.S. proportional der Dosis reduziert; doch konnte Adrenalin 10^{-6} g/ml selbst durch R.S. $2 \cdot 10^{-4}$ g/ml nicht völlig unterdrückt werden. Am Meerschweinchenileum unterdrückt R.S. $5 \cdot 10^{-6}$ g/ml die Wirkung von *Acetylcholin* 10^{-8} g/ml vollkommen, die aber nach dem Auswaschen vorübergehend verstärkt auftritt. Am Meerschweinchenileum verhindert R.S. 10^{-5}—10^{-4} g/ml, wenn 30 sec vorher zugeführt, die Wirkung von *Histamin* $2 \cdot 10^{-8}$ g/ml; auch hier zeigt sich nach dem Auswaschen vorübergehend eine Steigerung der Histamin-Kontraktion.

R. P. Banerjee (Calcutta) und H. F. Häusler (Graz): Verteilungsverfahren löslicher Rauwolfia-Alkaloide*

Die Zahl der aus verschiedenen Rauwolfia-Varietäten isolierten Alkaloide ist bereits sehr groß geworden, wobei manche stereoisomer sein mögen, z. B. kennt man z. Zt. aus *Rauwolfia serpentina* 22, aus *Rauwolfia canescens* 16 Alkaloide. Während bekanntlich Reserpin von der „oleoresin fraction" isoliert wurde, hat die Fraktionierung der wäßrigen Phase die Mehrzahl der Alkaloide geliefert. Während Basizitätsunterschiede beispielsweise bei der Isolierung von Ajmalin vorteilhafte Verwendung fanden, war vom Verteilungsverfahren zwischen ausgewählten Lösungsmitteln eine rationellere Arbeitsweise zu erwarten, vor allem hinsichtlich der Gewinnung jedes Alkaloids in nahezu reiner Form aus einem Rohextrakt. Dieses wurde aus einem im Unterdruck eingedickten Alkohol-Perkolat von Rauwolfia serpentina Benth. (Dehra Dun) hergestellt, dessen sirupartige Tropfen in 2% HCl durch 2 Std eingerührt wurden; nach Abfiltrieren der dunkelbraunen Lösung wurde der Rückstand durch eine weitere Stunde mit 2% HCl gerührt und wiederum abfiltriert. Die vereinigten Filtrate wurden mit NaOH auf p_H 10 gebracht und mit Chloroform extrahiert, dann wurde neuerlich mit 2% HCl behandelt und schließlich nochmals mit Chloroform extrahiert. Dieses letzte Extrakt wurde in einer aus 34 Einheiten bestehenden Verteilungsbatterie in einem System aus Chloroform und 0,2 mol Phosphatpuffer von p_H 4,7 ausgeschüttelt, wobei 6 Alkaloide isoliert werden konnten. Weitere Versuche mit 5% und 10% HCl-Totalextrakten sowie unter Verwendung von spezifischen Lösungspaaren sind im Gange.

R. Pulver (Basel): Die Potenzierung der narkotischen Wirkung von Barbitursäuren durch Derivate von Aryl-cycloalkyl-carbonsäuren

Mit 2 Textabbildungen

Im Verlaufe der zwei letzten Jahre ist in der amerikanischen Literatur eine Reihe von Arbeiten erschienen[1–6], in denen eine erhebliche Wirkungssteigerung verschiedenartiger Pharmaka durch gleichzeitige Verabreichung des Diäthylaminoäthylesters der Diphenylpropylessigsäure beschrieben wurde, einer Verbindung, die in den Laboratorien der Smith, Kline and French in Philadelphia synthetisiert und unter der Bezeichnung SKF 525 von verschiedenen Forschern untersucht worden ist.

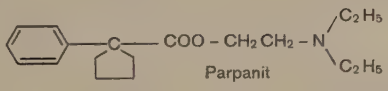
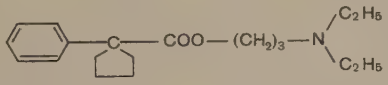
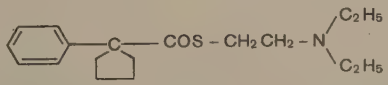
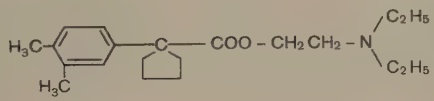
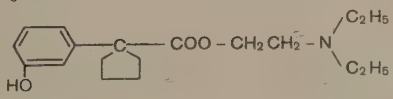
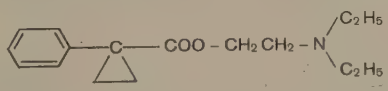
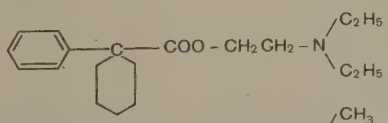
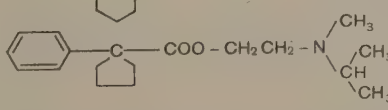
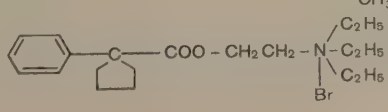
Die potenzierende Wirkung von SKF 525 läßt sich tierexperimentell besonders deutlich am Beispiel der Evipan-Narkose demonstrieren. Die Dauer der Narkose kann durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit dem Potentiator auf das 2- bis 3fache erhöht werden, und zwar unter Verwendung sehr niedriger Dosen, denen mit Sicherheit keine narkotische Wirkung zukommt. In sehr umfassenden Untersuchungen am National Heart Institute in Washington ist der Reaktionsmechanismus dieser Wirkungssteigerung studiert worden[7, 8]. Es konnte dabei gezeigt werden,

* Die ausführliche Veröffentlichung erfolgt im J. Pharm. Pharmacol.

daß die Potenzierung zustande kam durch eine Hemmung des Abbaus der Pharmaka durch die Fermente der Lebermikrosomen. Die durch SKF 525 gehemmten, fermentchemischen Prozesse des intermediären Abbaus umfassen: die Oxydation aliphatischer Seitenketten; die Desalkylierung von Alkylaminen; Desaminierungen; die Verseifung von Methoxylgruppen; die Paarung von Phenolen und die Oxygation aromatischer Verbindungen zu Phenolen.

All diesen durch SKF 525 gehemmten Prozessen ist gemeinsam, daß die daran beteiligten Fermente in den Lebermikrosomen lokalisiert sind, und daß sie nur in Gegenwart von Sauerstoff und reduziertem TPN stattfinden. Es ist die Vermutung geäußert worden, daß die gemeinsame Ursache all dieser sehr verschiedenartigen Fermenthemmungen in einer Blockierung von TPNH zu suchen ist.

Tabelle 1

	Struktur	Verlängerung der Narkosedauer	Dl 50 Maus i. v. mg/kg
I	SKF - 525 A	++	
II	 Parpanit	++	67
III			52
IV		—	42
V		+	44
VI		—	80
VII		—	78
VIII		+	42
IX		++	76
X		—	7.5

Durch geringe Änderungen der Struktur von SKF 525, z. B. durch Verlängerung oder Verkürzung der Alkylseitenkette, oder durch Ersatz der Wasserstoffatome des aromatischen Ringsystems durch Alkyl oder Halogen, gelangt man zu völlig wirkungslosen Verbindungen.

Einige Derivate der Arylcycloalkyl-carbonsäuren, die von F. Häfliger u. R. Denss synthetisiert wurden, ergaben dagegen starke potenzierende Effekte.

Es ist von großer Bedeutung, daß zur Messung der Narkosedauer ein einheitliches Tiermaterial (Mäuse derselben Zucht, von gleichem Geschlecht und möglichst

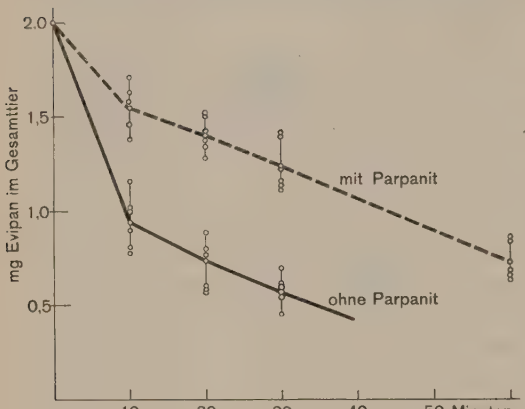


Abb. 1

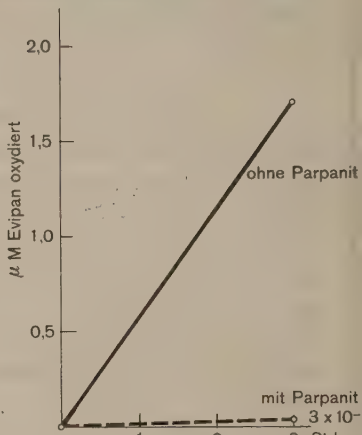


Abb. 2

von gleichem Alter und Gewicht) verwendet werden. Eine i.p.-Injektion von 80 mg Evipan/kg ergab in einer Gruppe von 10 Tieren eine Schlafdauer von durchschnittlich 21 ± 8 min. Der zu prüfende Potentiator wurde 40 min vor der Barbitursäure als wäßrige Lösung des Chlorhydrates i.p. verabreicht, in einer Dosis von 10 mg/kg. SKF 525 wurde in allen Versuchen als Vergleichspräparat mit untersucht und ergab eine Verlängerung der Narkosedauer auf das 2—4fache. Die Versuchsanordnung eignet sich nicht zur Messung feiner Unterschiede der Wirkungsintensität, dagegen kann man damit unwirksame Präparate, solche mit schwacher Wirksamkeit und Produkte hoher Aktivität erkennen.

Aus der Tab. 1 ist ersichtlich, daß der Diäthylaminoäthanolester der Phenylcyclopentancarbonsäure die Evipan-Narkose gleich stark verlängert wie SKF 525. Der analoge Thioester ist wirkungslos, ebenso der Ester des nächsthöheren Aminoalkohols. Substitution am aromatischen Ring mit Methyl oder Hydroxyl schwächt die Wirkung ab, Ersatz des Cyclopentanrings durch den 3-Ring hebt sie auf, die Cyclohexanverbindung dagegen zeigt eine schwache Wirkung. Bei Änderung der N-Alkylierung bleibt die Aktivität oft erhalten, während das Bromäthylat wirkungslos ist.

Die Abb. 1 zeigt die Hemmung des intermediären Abbaus von Evipan durch Parpanit bei der Maus. Nach i.p.-Verabreichung von 2 mg des

Narkoticums wurde der Evipangehalt des Gesamttieres nach der von Brodie beschriebenen Methode[9] bestimmt, ebenso bei Vorbehandlung der Tiere mit 10 mg/kg Parpanit. Bei den Kontrolltieren wird die Hälfte des verabreichten Narkoticums in 9 min abgebaut, während hierzu, nach Vorbehandlung mit Parpanit, 44 min benötigt werden.

Die Hemmung der Seitenkettenoxydation von Evipan durch Parpanit kann auch in vitro nachgewiesen werden.

Nach der Methode von Cooper[8] haben wir 2 g Kaninchen-Leberschnitte in 20 cm³ Krebs-Ringer-Phosphatpuffer suspendiert. Bei einer Substratkonzentration von 20 mg-% wurden dabei in 3 Std 1,7 μM Evipan in der Seitenkette oxydiert. Parpanit hemmt diese Reaktion praktisch vollständig in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ M.

Es konnte damit gezeigt werden, daß Parpanit, wie auch einige strukturverwandte Verbindungen, geeignet sind, die narkotische Wirkung von Barbitursäuren zeitlich zu verlängern, und daß dieser Effekt zustande kommt durch Hemmung des intermediären Abbaus des Narkoticums.

Literatur

[1] Axelrod, J., J. Reichenthal and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 49 (1954). — [2] Brodie, B. B., J. J. Burns, L. C. Mark, P. A. Lief, E. Bernstein and E. M. Papper: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 26 (1953). — [3] Cook, L., G. J. Navis, J. J. Toner and E. J. Fellows: Federat. Proc. **12**, 313 (1953). — [4] Cook, L., J. J. Toner and E. J. Fellows: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **111**, 131 (1954). — Cooper, J. R., J. Axelrod and B. B. Brodie: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **112**, 55 (1954). — [6] Macko, E., L. Cook, J. J. Toner and E. J. Fellows: Federat. Proc. **12**, 364 (1953). [7] Maxwell, J. M., L. Cook, G. J. Navis, J. J. Toner and E. J. Fellows: Federat. Proc. **12**, 349 (1953). — [8] Navis, G. J., J. J. Toner and L. Cook: Federat. Proc. **12**, 354 (1953). — [9] Toner, J. J., L. Cook and E. J. Fellows: Federat. Proc. **12**, 372 (1953).

H. Düker (Marburg/Lahn): Über die Wirkung sehr geringer Alkoholmengen auf die geistige Leistungsfähigkeit

In 9 Versuchsreihen (VRn), von denen sich jede über 6 Versuchstage (VTe) erstreckte, erhielten die Versuchspersonen (Vpn) ungefähr 20 min vor Beginn der Versuche täglich 250 cm³ Limonade. An 2 VTn war der Limonade 5 cm³ und an 2 anderen VTn 10 cm³ 80%iger Alkohol beigemischt, die übrigen 2 VTe waren alkoholfrei. Vpn waren Frauen und Männer, deren Alter zwischen 20 und 60 Jahren lag.

Die Versuchstätigkeit, die an die Konzentrationsfähigkeit hohe Anforderungen stellte, bestand im Rechnen von Aufgaben, die in einer bestimmten Art zusammengestellt waren. Die Methode ist kurz beschrieben in dieser Z. **212**, 113 ff. Das Rechnen dauerte an jedem VT 1 Std.

Die Versuchsergebnisse zeigten, daß in allen VRn die Leistung unter der Wirkung von 5 cm³ Alkohol gegenüber den VTn ohne Alkohol (Leer-VTn) um durchschnittlich 5,6% zurückgegangen und der Fehlerprozentsatz

um durchschnittlich 266% angestiegen war. Diese Leistungsverschlechterung wurde von den Vpn nicht bemerkt, ebenso auch nicht irgendwelche Alkoholwirkungen.

Das Rechnen unter der Wirkung von 10 cm³ Alkohol ließ gegenüber den VTn unter 5 cm³ keine weitere Verschlechterung der Leistung erkennen, meist sogar eine leichte, eindeutige Verbesserung. Nur in zwei Fällen war ein weiterer Leistungsrückgang von durchschnittlich 10%, in allen übrigen Fällen dagegen eine Leistungssteigerung von durchschnittlich 8% zu verzeichnen. Bei zwei Vpn lag die Leistung sogar um durchschnittlich 7,5% über derjenigen an den Leer-VTn. Eine leichte Erhöhung des Fehlerprozentsatzes hat nur in zwei Fällen stattgefunden, in allen übrigen dagegen eine Herabsetzung von durchschnittlich 14%.

Als Ursache hierfür kommen hauptsächlich *psychische Faktoren* in Betracht. Aus den Aussagen der Vpn kann gefolgert werden: Durch die Gaben von 10 cm³ Alkohol werden leichte Hemmungen gesetzt, die aber nicht deutlich bewußt werden. Ihre Intensität reicht indes aus, um zur stärkeren Anspannung anzuregen. Auch die 5 cm³-Gaben wirken hemmend, aber so gering, daß sie nicht einmal dunkel bewußt werden und daher nicht zur Erhöhung der Anspannung anregen. Die Verbesserung der Leistung durch die Gaben von 10 cm³ gegenüber denen von 5 cm³ könnte man als reaktive Leistungssteigerung bezeichnen.

G. A. Lienert (Marburg/Lahn): Pharmakopsychologische Untersuchungen über die Wirkungsunterschiede einiger Schlafmittel

Mit 3 Textabbildungen

Zwecks Untersuchung des Wirkungsverlaufes wurden je ein 5er, ein 6er und ein 7er-ringhydriertes Barbiturat (CYclopal, PHanodorm, MEdomin) und je ein Piperidin-(NOludar) und ein Harnstoffderivat (BRomural) innerhalb eines Planversuches mit einem Leerpräparat und untereinander verglichen.

Methode. 60 gesunde Studenten wurden nach einem Vortest in leistungsgleiche Gruppen von 6 und 4 Vpn. geteilt und erhielten am Versuchstag um 8 Uhr entweder ein (ED) oder zwei (DD) Tabletten der obigen Spezialitäten. Sodann mußten sie während der folgenden 7 (ED)- bzw. 12 (DD)-Std. angespannt rechnen. Das Verfahren ist von H. Düker auf der 17. Tagung beschrieben worden. Nach jeweils einer Rechenstunde wurde eine Pause von 20 min eingelegt, während welcher eine Selbsteinschätzung der Stimmungslage nach einer 5-Punkte-Skala und einer Flimmerverschmelzungs-Frequenzmessung mit einem von Mücher u. Wendt angegebenen elektronischen Impulsgenerator vorgenommen wurde.

Die *Ergebnisse* sind in den Abbildungen für die DD graphisch dargestellt. Die ED ergab geringere, im wesentlichen analoge und statistisch ebenfalls gesicherte Unterschiede.

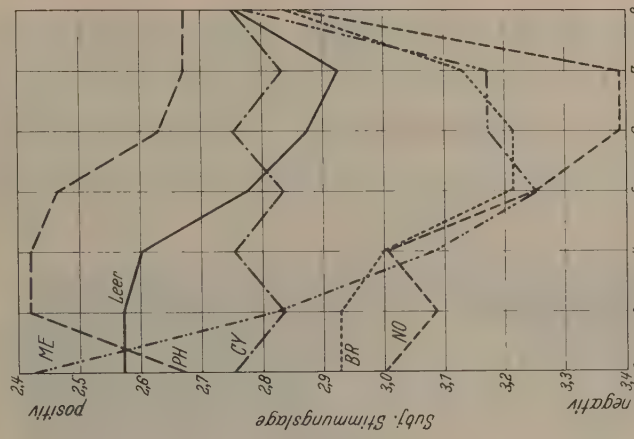


Abb. 3. Einfach ausgeglichene Verlaufskurve der subjektiven Stimmungslage im Dauerversuch

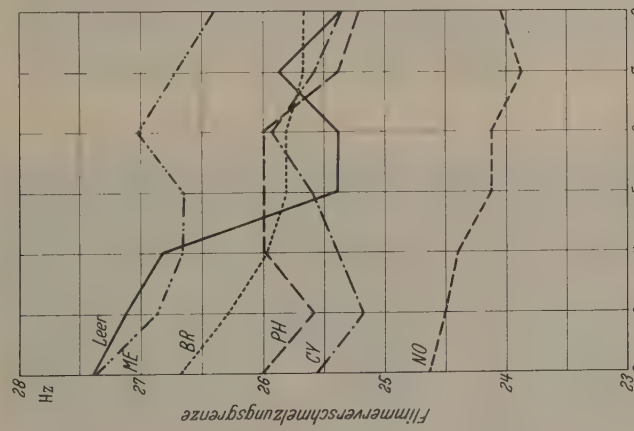


Abb. 2. Einfach ausgeglichene Verlaufskurve der Flimmerverschmelzungsfrequenz im Dauerversuch

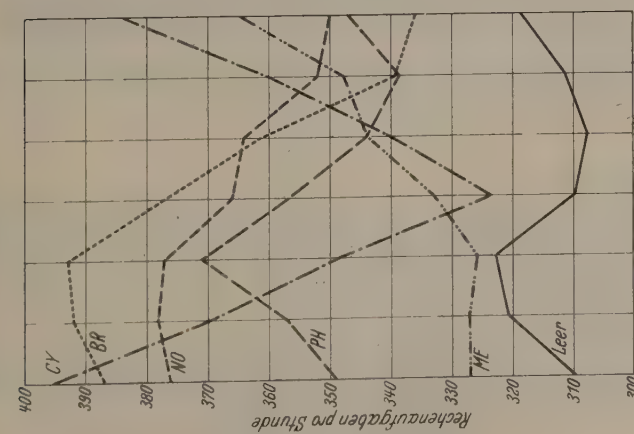


Abb. 1. Einfach ausgeglichene Verlaufskurve der Rechenleistungen im Dauerversuch

Interpretation zu Abb. 1. Entsprechend zu den Versuchen von H. Düker mit Alkohol wirkt die subjektiv merkbare Hemmung im Sinne einer reaktiven Leistungssteigerung. Wird die Hemmung im Verlauf der Wirkung stärker, so kommt es zu einem sekundären Leistungsabfall, dem eventuell ein erneuter Leistungsanstieg folgt: In diesem Sinne zeigen die Nicht-Barbiturate (BR, NO) einfache Verlaufsformen: Hoher Anstieg mit zeitlinearem Abfall. Alle 3 Barbiturate zeigen Sekundärabfall und Spätanstieg. Demgemäß ist die Hemmungsacme bei ME am frühesten, bei PH am spätesten erreicht. Zur Beurteilung der Wirkungsdauer erwies sich der 12-Std-Versuch als nicht ausreichend.

Zu Abb. 2. Die im Dauerleistungsversuch nicht differenzierbaren barbitursäurefreien Präparate konnten im Flimmertest signifikant unterschieden werden: Das Piperidinderivat (NO) verursachte eine lang andauernde Hemmung der visuellen Sukzessiv-Diskrimination. Unter den Barbituraten zeigt eines (ME) auf diesem Sektor möglicherweise (nicht signifikant) eine gewisse Stimulationswirkung. Die übrigen Hypnotica verhalten sich im Sinne der Erwartung.

Zu Abb. 3. Während sämtliche klinisch mild wirksamen Schlafmittel Dysphorie, Depression und Ermüdungsgefühl auslösen, fehlen letztere paradoxerweise bei den stark wirksamen Mitteln, offenbar zufolge einer euphorisierenden Komponente, die bei PH augenscheinlich ist.

Obige Interpretation des Wirkungsverlaufes wurde in Nachtschlafversuchen durch Registrierung der Schlaftiefe und Objektivierung der Nachwirkungen an 12 Versuchspersonen in lateinischer Quadratanordnung kritisch überprüft und im wesentlichen bestätigt. Über die Ergebnisse wird anderenorts (Dtsch. med. Wschr. 1955) berichtet werden.

Literatur

Düker, H.: Psychol. Forsch. **23**, 10 (1949). — Mücher, H., u. H. W. Wendt: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 29 (1951).

G. Quadbeck (Heidelberg): Die Auswertung anticonvulsiver Verbindungen am audiogenen Krampf der Ratte

Mit 3 Textabbildungen

Bei vielen Ratten läßt sich durch bestimmte akustische Reize ein Krampf auslösen (Donaldson), der als ein dem großen epileptischen Anfall entsprechendes pathologisches Geschehen angesehen werden kann (Griffiths). Bei diesem Krampf unterscheiden wir drei aufeinanderfolgende charakteristischen Stadien:

1. Das Laufstadium: Nach kurzer Einwirkung des Schallreizes (1 bis 60 sec) rennen die Tiere aufgeregt bei erhaltenem Bewußtsein im Käfig herum, wobei die Tiere Hindernissen ausweichen.

2. Das Sprungstadium: Das Laufen geht plötzlich in wilde ungehemmte Sprünge über, wobei die Tiere, ohne den Stoß abzufangen oft gegen die Wände ihres Käfigs prallen.

3. Das Krampfstadium: Die Tiere fallen in einen meist zuerst tonischen Krampf (Abb. 1), der nach kurzer Zeit in zunehmendem Maße klonisch wird. Während die ersten beiden Stadien bei allen Tieren recht ähnlich verlaufen, zeigt das dritte Stadium eine bunte Vielfalt von

Abb. 1. Ratte im Krampfstadium

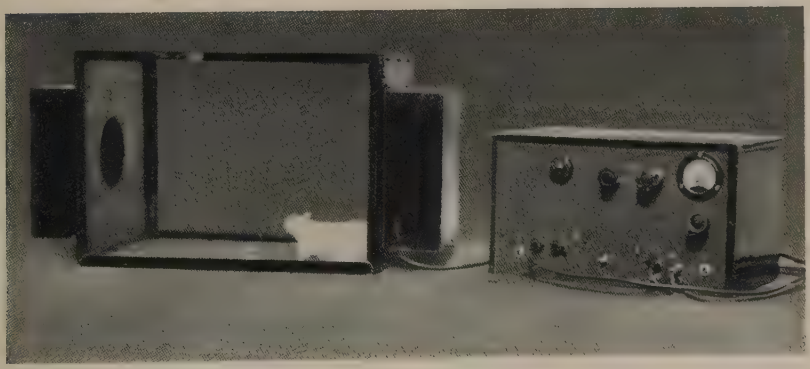


Abb. 2. Versuchsanordnung zur Auslösung audiogener Krämpfe. Das Versuchstier kommt in den links stehenden Kasten, der oben, vorne und hinten mit 10 mm dicken Glasplatten verschlossen ist. In den beiden seitlichen Kästen befinden sich je ein Hochtonlautsprecher mit einer Leistungsaufnahme von je 3 Watt, die von dem rechts stehenden Tonfrequenzsender geliefert werden

Bildern, die aber für das Einzeltier von Anfall zu Anfall weitgehend übereinstimmen und für dieses charakteristisch sind. Das Krampfstadium hält selten länger als 1 min an, wenn der Schallreiz bei Eintritt des zweiten Stadiums unterbrochen wird. Nach Beendigung des Krampfes liegt das Tier meist erschöpft im Käfig und erreicht erst etwa nach 1 Std wieder seine volle Krampfbereitschaft.

Ratten, die viele derartige Anfälle gehabt haben, zeigen im Gehirn ausgedehnte elektive Parenchymnekrosen, die weitgehend denen

entsprechen, die Scholz in den Gehirnen alter Epileptiker beschrieben hat. Der Anteil krampfanfälliger Ratten ist von Stamm zu Stamm verschieden. Nach Angaben von Finger hat man in Amerika zwischen 5 und 95% Anfälligkeit beobachtet. Unser eigener Rattenstamm hat eine Anfälligkeitsrate von etwa 15%, die wir durch geeignete Zucht auf 30 bis 40% (einzelne Würfe sind 100%ig anfällig) steigern konnten.

Diese Krämpfe, für die sich die Bezeichnung „audiogene Krämpfe" heute allgemein eingeführt hat, können durch Antiepileptica verhindert werden. Allerdings ist es notwendig, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, konstante Versuchsbedingungen hinsichtlich der Ernährung der Tiere („Latz Standardkost"), der Frequenz und Intensität des Schallreizes, sowie der Krampfbereitschaft der Versuchstiere einzuhalten. Zur Erzeugung des Schallreizes verwenden wir einen Tonfrequenzsender, der auf eine Grundfrequenz von 12 KHz so abgestimmt ist, daß der erste Oberton etwa in der gleichen Intensität wie der Grundton an die Lautsprecher der in Abb. 2 dargestellten Apparatur abgegeben wird. Zum Versuch kommen die Ratten in den Versuchskasten und werden bis zum Eintritt des zweiten Stadiums, höchstens aber 60 sec, dem Schnellreiz ausgesetzt. Für unsere Versuche verwenden wir nur solche Ratten, die in 8 (in 1stündigen Abständen) aufeinanderfolgenden — Versuchen mindestens 7mal krampfen, ohne daß hierbei die Zeitspanne zwischen dem Beginn des Schallreizes und dem ersten Sprung des zweiten Stadiums nennenswert zunimmt.

Zur Prüfung eines Anticonvulsivums dienen für jede Dosis mindestens 10 Ratten, von denen aber bei jedem Test nur die 8 am stärksten krampfenden Ratten gewertet werden. So wird verhindert, daß ein einmaliges Aussetzen einer Ratte, das sich auch bei den anfälligsten Tieren nicht immer mit Sicherheit vermeiden läßt, eine krampfhemmende Wirkung vortäuscht. Die Präparate werden entsprechend der klinischen Anwendung peroral gegeben.

In Abb. 3 sind 6 gebräuchliche handelsübliche Anticonvulsiva in ihrer Wirkungsweise auf die „audiogenen Krämpfe" dargestellt. Es zeigt sich, daß z. B. Diphenylhydantoin, das trotz seiner guten klinischen Wirksamkeit den Cardiazolkrampf nicht beeinflußt und den Elektrokrampf nur modifiziert, nicht aber verhindert, in diesem Test eine lang anhaltende, wenn auch nur langsam einsetzende Wirkung zeigt, während Trimethyloxazolidindion (Tridione), das gegenüber dem großen Anfall trotz seiner Wirksamkeit in den üblichen pharmakologischen Testen praktisch unwirksam ist, zwar eine schnell einsetzende, aber auch bei hoher Dosierung nur kurze Wirkung zeigt. Diese Verhältnisse beim Tridione können vielleicht die überraschend gute Wirkung dieses Präparates beim Status epilepticus erklären. Auch die übrigen dargestellten klinisch wirksamen Präparate zeigen in diesem Test eine gute Wirkung.

Uneinheitlich wie das Bild der menschlichen Epilepsie ist auch die Wirksamkeit einzelner Anticonvulsiva bei verschiedenen Patienten. Genau so wenig, wie zu erwarten ist, daß man einmal mit einem einzigen Präparat alle verschiedenen Formen der Epilepsie wird behandeln können, darf man hoffen, allein mit *einem* pharmakologischen Test bei der

Prüfung der Antiepileptica auszukommen. Die hier beschriebene Methode kann daher, obwohl das ihr zugrunde liegende Krampfgeschehen dem

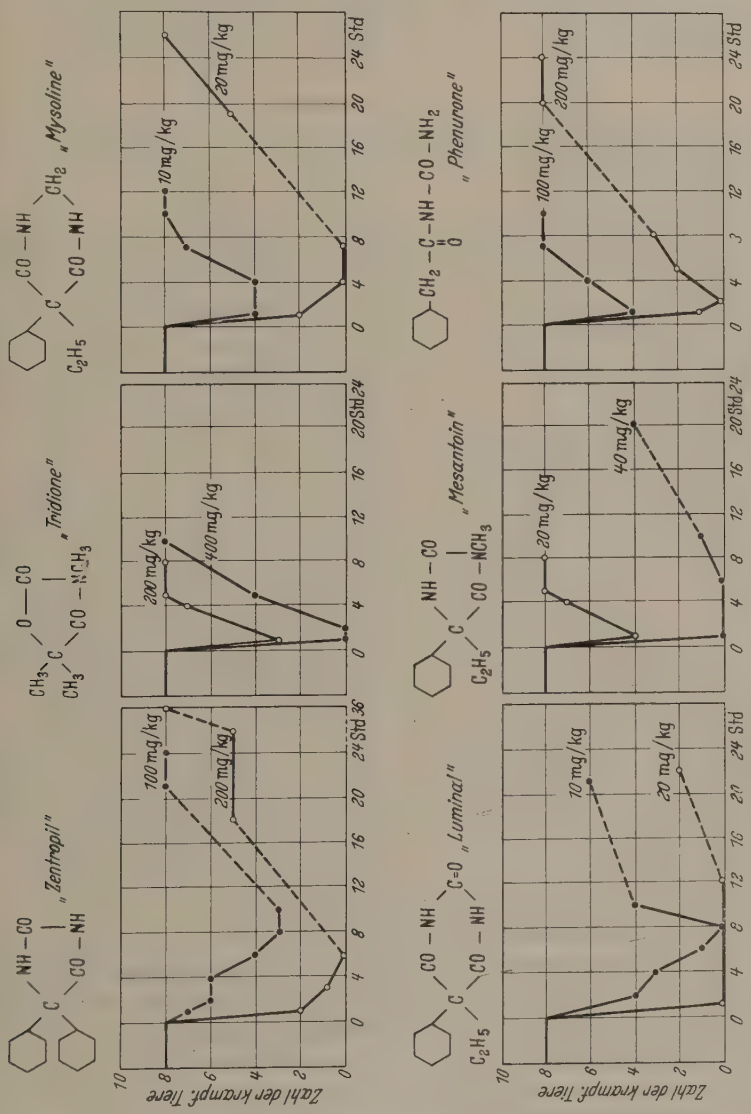


Abb. 3. Beeinflussung audiogener Krämpfe durch Anticonvulsiva. Bei der Zeit 0 erhielten die Tiere die jeweils bei den einzelnen Kurven stehenden Substanzmengen als wäßrige Suspension mit der Schlundsonde

grand mal beim Menschen näher kommt, als dies bei den sonst üblichen experimentellen Methoden der Fall ist, doch diese nicht ganz ersetzen, sondern nur ergänzen, und so vielleicht mit dazu beitragen, das Experiment am Kranken einzuschränken.

Literatur

Donaldson, H. H.: The rat: data and reference tables Philadelphia 1924. — Finger, F. W.: Psychologic. Bull. **44**, 201 (1947). — Griffiths, W. J.: J. Comp. a. Physiol. Psychol. **33**, 291 (1942). — Scholz, W.: Die Krampfschädigungen des Gehirns. Berlin 1951.

A. Oberdorf (Düsseldorf): Wirkung verschiedener Analeptica auf das Hirnstrombild bei Schlafmittelvergiftung

Uns interessierte die Frage, ob und wie verschiedene als Analeptica propagierte Substanzen bei experimenteller Barbituratvergiftung das EEG beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde an Katzen in leichter Evipannarkose unter Beobachtung des arteriellen Drucks und künstlicher Beatmung das EEG beiderseits parietal unipolar gegen die Nasenwurzel abgeleitet. Nach mehr oder weniger starker Vergiftung mit Luminal-Na (150—250 mg/kg i.v.), die zu partieller oder totaler Depression der Hirnstromaktivität führte, gaben wir folgende Analeptica i.v.: Coramin, Coffein, Pervitin, Cardiazol, Strychnin oder Pikrotoxin.

In kleinen Dosen änderten Coramin (10—30 mg/kg), Coffein (100 mg/kg) und Pervitin (1—5 mg/kg) das EEG nicht, in größeren Dosen (Coramin 100—500 mg/kg, Coffein bis 400 mg/kg, Pervitin bis 20 mg/kg) vertieften sie die Depression. In diesen Fällen war bei den genannten Stoffen eine Reaktivierung durch Cardiazol möglich. Cardiazol allein vermochte in Dosen von 20—60 mg/kg die Luminalwirkung auf das EEG vollständig aufzuheben und das Ausgangsbild wieder herzustellen. Die erhebliche Sicherheitsbreite des Cardiazol geht daraus hervor, daß unter Luminalvergiftung motorische Erscheinungen erst bei Dosen von etwa 150 mg/kg, Krampfanfälle erst nach durchschnittlich 400—600 mg/kg auftraten. Strychnin vermochte nur in Krampfschwellendosen (1 bis 2,5 mg/kg) und dann lediglich in abnormer Weise das EEG zu reaktivieren: Nur angedeutet fanden sich seitenungleiche Barbituratspindeln wie beim Ausgangsbild oder nach Cardiazol.

Ähnlich lagen die Verhältnisse bei Pikrotoxin (0,5—3,0 mg/kg). Nach Gaben von Strychnin oder Pikrotoxin ließ sich auch durch Cardiazol das Ausgangsbild nicht wieder erreichen. Bei Verwendung von Veronal-Na anstelle von Luminal-Na ergab sich nach den bisher unternommenen Versuchen ein ähnliches Bild.

Die vorgelegten Befunde, die auch am EEG einen ausgeprägten Antagonismus zwischen Barbituraten und Cardiazol erkennen lassen, stützen zahlreiche Erfahrungen der Klinik und mit verschiedenen Methoden angestellter Tierversuche. Die Anwendung von Cardiazol bei Barbituratvergiftung des Menschen erscheint auch im Hinblick auf unsere Resultate durchaus berechtigt.

G. Kühn (Berlin): Beitrag zur Pharmakologie des N-Methylpyridins

Das p-acetylaminobenzolsulfonsaure Salz des N-Methylpyridins (P_1) wurde mit Euphyllin verglichen.

P_1 bewirkte an Ratten, denen 16 Std vor Versuchsbeginn Futter und Wasser entzogen und zum gleichen Zeitpunkt und unmittelbar vor Versuchsbeginn je 5 ml physiologische Kochsalzlösung/100 g Körpergew. oral zugeführt worden waren, eine Diuresesteigerung, die abhängig von der Dosis war: Bei s.c. Gabe hatten 200 mg P_1/kg Körpergew. die stärkste Diuresesteigerung zur Folge, bei oraler Gabe 800 mg P_1/kg Körpergew. Die diuretische Wirkung setzte schneller ein als beim Euphyllin und klang schneller wieder ab. Das Diuresemaximum wurde bei s.c. Gabe von 200 mg P_1/kg Körpergew. 20 min früher erreicht als bei den Kontrolltieren und betrug im Vergleich zum Maximum der Kontrolltiere 225%. Die absolut größte Differenz der ausgeschiedenen Urinmengen wurde nach 2 Std erreicht. Danach war die Diurese der Kontrolltiere bis zum Versuchsende nach 8 Std größer als die der Versuchstiere. Dabei wurde die von den Versuchstieren ausgeschiedene Urinmenge von den Kontrolltieren nicht erreicht. Die Diuresesteigerung war signifikant. Sie entsprach in ihrem Ausmaß — nach s.c. Gabe von 200 mg P_1/kg Körpergew. — der Diuresesteigerung nach s.c. Gabe von 50 mg Euphyllin/kg Körpergew. (bezogen auf den Theophyllingehalt).

Durch einen Dauerversuch an Ratten mit 25maliger s.c. Gabe von 200 mg P_1/kg Körpergew. im Abstand von 2—4 (im Mittel 2,46) Tagen wurden Tachyphylaxie und Kumulation ausgeschlossen.

Neutralisierung der schwach sauren P_1-Lösungen führte zu keiner Wirkungsminderung.

Die Acetylsulfanilsäure allein hatte keine diuretische Wirksamkeit. Das p-toluolsulfonsaure Salz des N-Methylpyridins (P_2) hatte die gleiche diuretische Wirksamkeit wie das P_1.

Am Kaninchen in Urethannarkose, bei dem der Urin mittels Katheter aus der operativ eröffneten Harnblase gewonnen wurde, hatten 20 mg P_1/kg Körpergew. i.v. die gleiche diuretische Wirkung wie 5 mg Euphyllin/kg Körpergew. i.v. — P_1 bewirkte einen kurzfristigen geringen Blutdruckanstieg, der der Diuresesteigerung parallel ging. Gleichzeitige Gabe von 20 mg P_1 und 5 mg Euphyllin/kg Körpergew. führte zu einer Verlängerung der Diuresesteigerung, nicht zu einer Vergrößerung der Urintropfenzahlen/min.

Die akute Toxicität von P_1 an der Maus wurde als LD 50 bestimmt und betrug 1030 mg/kg Körpergew. bei s.c. Gabe. Für Euphyllin betrug sie 186 mg/kg Körpergew. Bei täglicher s.c. Injektion von 200 mg P_1/kg Körpergew. starben Mäuse im Mittel nach 40 Injektionen. Die histologischen Untersuchungen ergaben toxische Leberverfettungen.

Zur Prüfung der Leistungsfähigkeit unter der P_1-Wirkung erhielt eine Gruppe von 10 Ratten täglich 200 mg P_1/kg Körpergew. s.c. injiziert. ¾ Std danach wurden die Tiere in Lauftrommeln gebracht und bei täglich steigenden Strecken im Laufen trainiert. Eine gleich große Kontrollgruppe wurde mitgeführt. Die Laufstrecke betrug am letzten der 33 Versuchstage 6 km. Je 3 Tiere starben in der Versuchs- und Kontrollgruppe. Die Tiere der P_1-behandelten Gruppe legten insgesamt 573,5 km, die Tiere der Kontrollgruppe 538,3 km zurück.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß das P_1 ein kräftig wirksames Diureticum von geringer Toxicität ist. Die Schnelligkeit des Wirkungseintritts, die prompte Wirkung auch in Narkose und die Parallelität zu Blutdruckänderungen sprechen zusammen für eine periphere Kreislaufwirkung, ohne daß es zu Kreislaufschäden kommt, wie durch den Rattenlaufversuch bewiesen werden konnte.

M. Taeschler und E. Rothlin (Basel): Zur Charakterisierung der zentralen Wirkung von Phenothiazinderivaten

Die zentrale Wirkung von zwei Phenothiazinderivaten, dem 3-Chlor-10-(3′-dimethylamino-propyl)-phenothiazinchlorhydrat (Chlorpromazin) und dem 3-Chlor-10-(2′-(N-methyl-piperidyl-2′′)-äthyl)-phenothiazinchlorhydrat (NP 207) wurde im Vergleich zu der des Na-Pentobarbitals (Nembutal) untersucht. Der Wirkungstypus von Chlorpromazin und NP 207 war gleich; ersteres erwies sich quantitativ jedoch etwas stärker wirksam. Die zentrale Wirkung wurde an folgenden Testen geprüft:

1. Aktivitätsphänomene. Die an der Maus im Zitterkäfig gemessene Spontanbewegung und Amphetamin-, Coffein- oder Morphiumerregung, werden durch die beiden Phenothiazinderivate in Dosen von 1—5 mg/kg i.v. stark und anhaltend gehemmt. Niedere Dosen von Na-Pentobarbital führen zur Aktivitätsverstärkung, erst narkotische Dosen von 60 mg/kg i.v. unterdrücken die Bewegung völlig, aber nur kurzdauernd. Damit resultiert ein Wirkungsverhältnis Phenothiazinderivat—Nembutal von 1:10—20.

2. Elektrencephalogramm (EEG). Ein analoger Wirkungsunterschied zeigt sich am Kaninchen-EEG, bei dem Phenothiazinderivate und Nembutal ebenfalls in einem Dosenverhältnis von 1:10—20 zu Spindelaktivierung und zu gehäuftem Auftreten von langsamen Wellen führen.

3. Morphiumantagonismus. Kleinere Dosen von Na-Pentobarbital (20—30 mg/kg i.v.) hemmen Morphin-Mydriase und Straub-Phänomen (S-Stellung des Schwanzes) an der Maus, wogegen eine relativ höhere Dosis der Phenothiazinderivate zu einem gleichen Hemmeffekt benötigt wird (6 mg/kg NP 207).

4. Narkosepotenzierung. Ein ungefähr gleiches Wirkungsverhältnis NP 207 zum Na-Pentobarbital (3:14 mg/kg i.v.) ergibt sich bei der Barbituratpotenzierung. Als ED 50 wird diejenige Dosis einer Substanz bestimmt, die bei 50% der Tiere eine nicht narkotisch wirksame Pentothal-Dosis (von 20 mg/kg i.v.) so verstärkt, daß eine Narkosedauer von mehr als 2 min resultiert.

5. Temperaturbeeinflussung. Die Schwellendosen für eine Temperatursenkung bei der Ratte (d. h. Abfall von 0,7° C) betragen 5 mg/kg s.c. NP 207 bzw. 10 mg/kg s.c. Na-Pentobarbital (Wirkungsverhältnis 1:2).

6. Kreislaufreflexe. Je 2 mg/kg i.v. der beiden Präparate hemmen gewisse Kreislaufreflexe (Carotis occlusion und i.v. Veratridineffekt) bei der narkotisierten Katze (Wirkungsverhältnis 1:1).

7. Krampfphänomene. Krampferscheinungen nach Coramin (500 mg/kg s.c.), Cardiazol (80 mg/kg s.c.) und Nicotin (15 mg/kg s.c.) werden durch 20 mg/kg NP 207 oder Chlorpromazin nur abgeschwächt, nicht aber aufgehoben. Der Strychninkrampf wird nicht beeinflußt. Im Gegensatz hierzu hemmen schon 5—10 mg/kg Na-Pentobarbital den Cardiazol-, Nicotin-, Coramin- und Strychninkrampf. 20 mg/kg Nembutal zeigen völlige Hemmung. Das Wirkungsverhältnis von Phenothiazinderivat zu Nembutal liegt demnach in der Größenordnung von 1:0,1.

8. Narkose und Erbrechen. Die narkotische und ataktische Wirkung fehlt den Phenothiazinderivaten, wogegen umgekehrt dem Na-Pentobarbital in nicht narkotischen Dosen die für die Phenothiazinderivate typische Hemmung des Apomorphinerbrechens fehlt.

9. Beeinflussung durch Serotonin-Hemmstoffe. Bei der Barbituratverstärkung ergibt sich nicht nur ein quantitativer Unterschied zwischen den beiden Pharmaka, sondern auch ein qualitativer: Die narkosepotenzierende Wirkung des NP 207 wird durch spezifische Hemmstoffe des Serotonins (LSD 25 und Br.LSD 1—5 mg/kg s.c.) abgeschwächt, wogegen aber der entsprechende Na-Pentobarbiturateffekt durch diese Serotoninhemmstoffe nicht beeinflußt wird. (Bei der Interpretation dieses Befundes muß allerdings berücksichtigt werden, daß etwa 10mal größere Dosen von LSD 25 und Br.LSD benötigt werden zur Hemmung der NP 207 Barbituratpotenzierung als zur Hemmung der Serotonin-Narkoseverstärkung.)

Inwieweit dieser mit Hilfe der Serotonin-Hemmstoffe gefundene Unterschied in kausalem Zusammenhang steht mit der aus diesen Versuchen resultierenden ausgesprochenen Wirkung der Phenothiazinderivate auf die Aktivitätsphänomene und der relativ starken Wirkung der Barbiturate auf Krampfphänomene muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Diskussion. Krause (Hannover): Es ist richtig, daß Chlorpromazin bereits in geringen Dosierungen Aktivitätsphänomene hemmt. Diese Dosierungen liegen immer noch höher als diejenigen, die zur Hemmung pressoreceptorischer Kreislaufreflexe benötigt werden. Die zur Narkosepotenzierung und Antischockwirkung erforderlichen Dosierungen liegen allerdings noch höher als die sedativ wirksamen. Beim Hund erzeugen Dosierungen über 0,05 mg/kg Adrenolyse und Sympathicusdämpfung, für eine Hemmung der Aktivitätsphänomene werden 0,3—0,6 mg/kg benötigt, für eine „potenzierte Narkose" und die Schockprophylaxe sind Dosierungen unter 2 mg/kg nicht sicher wirksam.

Gross (Basel): In Ergänzung früherer Untersuchungen haben wir zusammen mit Tripod den Einfluß von Chlorpromazin und dem in verschiedener Hinsicht ähnlichen Reserpin sowie von Phenobarbital und Glutetimid vergleichend auf die analgetische und die erregende Wirkung von Morphin an der Maus untersucht. Während Chlorpromazin und Reserpin die Morphinanalgesie verstärken und vor allem verlängern, dämpfen sie dessen erregende Effekte. Andererseits steigern Phenobarbital und Glutetimid die Morphinerregung, schwächen dagegen dessen analgetischen Effekt leicht ab. Die verschiedenartige Beeinflussung zentraler Wirkungen von Morphin ist ein weiteres Beispiel zur Differenzierung typischer Hypnotica von Reserpin und Chlorpromazin.

Rummel (Düsseldorf): Megaphen und Reserpin können den zur Narkose nötigen H_2O-Druck um 5% und mehr reduzieren. Von Reserpin braucht man $^1/_{10}$ der Megaphendosis. Megaphen wirkt kürzer. Bei der zur Verstärkung der Narkose nötigen Reserpindosis schlafen die Tiere im Gegensatz zu Megaphen meistens.

Kroneberg (Mannheim): In Analogie zu den Versuchen von Taeschler stehen eigene Untersuchungen über den Einfluß von Reserpin und Barbituraten auf die Motilität und den Sauerstoffverbrauch der Maus. Gibt man Reserpin in Dosen, welche die Motilität völlig auslöschen, so ist der O_2-Verbrauch nur um etwa 20—30% herabgesetzt. Wenn man hingegen die Motilität mit Barbituraten vollständig zum Erliegen bringt, was praktisch nur mit narkotischen Dosen zu erreichen ist, so ist der O_2-Verbrauch weitaus stärker, teilweise bis zu 80% des Normalwertes vermindert. Die Motilität wird durch Reserpin also viel selektiver als durch Barbiturate gehemmt.

Holzbauer (Edinburgh): Die Narkosepotenzierung durch Reserpin und Megaphen scheint nach Brodie auf 2 prinzipiell verschiedenen Mechanismen zu beruhen. Die Wirkung von Reserpin ist durch LSD zu hemmen, die von Megaphen nicht. Durch Reserpin kommt es zu einer starken Reduzierung des Serotoningehaltes in Darm, Blutplättchen und Hirn. Megaphen ist in dieser Richtung unwirksam.

Schlußwort. Taeschler: Zur Charakterisierung der zentralen Wirkung der Phenothiazinderivate wurden Testobjekte herangezogen, die einen Vergleich mit Nembutal gestatten. Aus diesem Grunde konnte die adrenolytische Wirkung nicht einbezogen werden, weil lediglich die Phenothiazinderivate in diesem Test wirken.

Eine Hemmung des narkosepotenzierenden Effektes von Chlorpromazin durch LSD wurde nicht untersucht. Die Prüfung blieb auf NP 207 beschränkt. Die benötigte LSD-Dosis liegt relativ hoch im Verhältnis zur Hemmung von Serotonin und der Hemmeffekt ist selbst dann nur partiell. Man muß deshalb eine Versuchsanordnung wählen, die auf diese Serotonin-Hemmung relativ empfindlich ist.

Z. Madjerek und P. Stern (Sarajevo): Einfluß von Chlorpromazin auf den Brechmechanismus der Tauben

Die Auffassung vom zentralen Brechmechanismus erfuhr in neuester Zeit gründliche Modifizierungen durch Borison u. Wang[1]. Diese Verff. zeigten, daß das Brechzentrum zwar in der dorsalen Reticularformation des verlängerten Rückenmarks gelegen ist, daß aber außerdem in der Area postrema eine spezifische chemoreceptive Zone besteht, über welche im allgemeinen die Wirkung der sogenannten zentralen Brechmittel erfolgt. Diese chemoreceptive Zone besteht somit aus mehreren Arten von Receptoren, die sich zwecks Aufnahme spezifischer Brechreize differenziert haben; die selektive Dämpfung der Brechreaktion auf verschiedene Brechreize mittels Drogen wie Chlorpromazin könnte dadurch erklärt werden. Die bei verschiedenen Tierarten vorhandenen Unterschiede im Aufbau dieser chemoreceptiven Zone erklären uns die Unterschiede in der Wirkung gleicher Brechmittel bei verschiedenen Tierarten, wie das bei Hund und Katze gezeigt wurde[2].

Es interessierte uns, ob bei Vögeln ein ähnlicher Mechanismus besteht. Wir versuchten deshalb bei Vögeln mit Chlorpromazin auf das Digitalis- und Apomorphinerbrechen einzuwirken. Wir gebrauchten die Digitalisauswertungsmethode nach Hanzlik und fanden im Vorversuch, daß ED 50 0,5 cm³ der jugoslavischen Standardtinktur entspricht. Intramuskuläre Verabreichung von 7,8—20 mg Chlorpromazin/kg Körpergew. 2—4 Std vor der Auswertung konnte bei Tauben das Digitaliserbrechen nicht hindern, es besteht also diesbezüglich eine Ähnlichkeit zwischen Tauben und Säugetieren, bei welchen Chlorpromazin ebenfalls das Digitaliserbrechen nicht verhindern kann[3]. Vorversuche an Tauben mit Apomorphin zeigten, daß Apomorphin in Dosen bis zu 50 mg pro Taube i.m. und bis zu 30 mg pro Taube i.v. kein sicheres Brechmittel ist, wie das sonst bei Säugetieren mit viel kleineren Dosen der Fall ist. Unsere Versuche stimmen mit den neulich veröffentlichten Resultaten von Koster[5] überein. Kleinere Dosen erzeugen den Pick-trieb, größere erzeugen zentrale toxische Effekte, Krämpfe und Tod. Eine vorhergehende Behandlung der Tauben mit Chlorpromazin (5 mg pro Taube 1—3 Std vorher) vermochte die Empfindlichkeit der Tauben gegen die emetische und zentrale toxische Wirkung des Apomorphins nicht zu verhindern, es zeigten sich vielmehr Zeichen der Sensibilisierung. Den gleichen Fall hatten wir auch mit Pikrotoxin in Dosen zu 0,05—0,20 mg/100 g Körpergew. der Taube.

In Zusammenhang mit diesen Resultaten untersuchten wir auch den Einfluß von Chlorpromazin auf die Digitalistoxicität an Tauben (Auswertung nach Braun u. Lusky) und an Meerschweinchen (Auswertung nach van Wijngaarden). Bei Tauben konnte Chlorpromazin in Dosen

zu 5 mg pro Taube (1—2 Std Wirkungsdauer) die Empfindlichkeit gegen Digitalis nicht herabsetzen, in einigen Fällen zeigte sich die tödliche Dosis Digitalis um 10—15% geringer als die kleinste tödliche Dosis in der Kontrollgruppe; bei Meerschweinchen hingegen konnten 6—10 mg Chlorpromazin/kg die tödliche Dosis Digitalis um durchschnittlich 23% vermindern, was noch ausdrücklicher für eine Sensibilisierung spricht. Die Körpertemperatur der Tauben (in der Kloake gemessen) wurde unter dem Einfluß von 7,8—20,0 mg Chlorpromazin/kg im Laufe von 1—4 Std höchstens um 1,7° C, meistens um weniger als 1° C herabgesetzt; dies entspricht der Beobachtung, daß Vögel im allgemeinen sich schwerer abkühlen als Säugetiere[4]. Die Äthernarkose konnte bei Tauben unter dem Einfluß von Chlorpromazin nicht vertieft werden.

Literatur

[1] Borison, H. L., and S. C. Wang: Pharmacol. Rev. **5**, 193 (1953). — [2] Borison, H. L., and K. R. Brezzee: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **77**, 38 (1951). — [3] Brand, E. D., T. D. Harris, H. L. Borison and L. S. Goodman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, 86 (1954). — [4] Gjaja, I.: Persönliche Mitteilung. — [5] Koster, R.: Federat. Proc. **14**, 360 (1955).

S. R. Dasgupta (Calcutta) und H. F. Häusler (Graz): Beiträge zur Analyse der Chlorpromazin-Wirkungen

Chlorpromazin führt bei nicht narkotisierten Katzen zu einer Verminderung, bei narkotisierten oder decerebrierten zu einer Steigerung der *Atemfrequenz*. Da bei den letzteren beiden gleichzeitig eine Blutdrucksenkung auftritt, wurde zur Feststellung der reflektorischen Bedingtheit der Atemfrequenzänderungen eine doppelseitige Vagektomie vorgenommen, wonach trotz der bestehenbleibenden Blutdrucksenkungen sämtliche Atemfrequenz-Änderungen unterbleiben.

Chlorpromazin, welches allein keine signifikante Verminderung der *Diurese* bei Ratten hervorruft, hat auf die nicotingehemmte Diurese eine potenzierende Wirkung, z. B. 100-min-Kontrolle: 5,3 ± 1,6 cm³, Chlorpromazin: 4,0 ± 1,1 cm³, Nicotin: 2,6 ± 0,6 cm³, Nicotin + Chlorpromazin: 1,0 ± 0,7 cm³.

Der durch Chlorpromazin völlig zu unterdrückende natürliche *Oestrus* an virginellen Ratten wird als eine der generellen Hypothalamus-Wirkungen aufgefaßt. Da aber bezüglich dieser bereits mehrfach gegenteilige Befunde vorliegen, z. B. hinsichtlich der Freisetzung des antidiuretischen Hormons (entweder durch Nicotin oder durch osmotische Reize) und des ACTH beim operativen Schock, wurde Chlorpromazin an ovarektomierten Ratten untersucht, bei denen künstlich ein Daueroestrus

aufrechterhalten wurde: Hierbei konnte keine Wirkung des Chlorpromazins festgestellt werden, so daß in diesem Falle des Ausschlusses eines peripheren Angriffspunktes weiterhin an einer zentralen Chlorpromazinwirkung festgehalten werden muß, wenn auch einstweilen unverständlich bleibt, daß und wie eine einzelne Hypothalamusfunktion beeinflußt werden kann.

H. Kopera (Graz): Wirkung einiger Kreislaufmittel und Analeptica auf Blutdruck und Atmung nach Chlorpromazin

Versuchstiere: Kaninchen, Katzen. Narkotica: Äther, Chloralose Urethan, Pernocton. Unterkühlung (Uk) mittels Schnee. Zufuhr aller, Testsubstanzen auf intravenösem Wege.

500 μg bis 1 mg/kg Chlorpromazin (Chl) verhindern die blutdrucksteigernde Wirkung der zentral angreifenden Kreislaufmittel Coramin und Vandid (= Vanillinsäurediäthylamid) und in fast ebensolchem Maße die von Cardiazol. Den Blutdruckeffekt von Sympatol und Noradrenalin, der durch periphere Gefäßwirkung zustande kommt, verkleinern die genannten und auch höhere Dosen Chl nur geringgradig. Dieselben Befunde wurden auch nach Uk auf etwa 30° und 25° C erhoben. In keinem Falle (Chl allein, Uk allein, Chl + Uk) trat nach einem der geprüften Mittel eine bemerkenswerte Umkehr der Blutdruckwirkung auf. Die bekannte starke adrenolytische Wirkung von Chl wurde bestätigt, eine deutliche Adrenalin-Umkehr nur an Hunden beobachtet. Die atemanregende Wirkung von Vandid, Coramin und Cardiazol blieb sowohl nach Chl als auch nach Uk erhalten, soweit in letzterem Falle nicht künstliche Beatmung notwendig war.

H. Friebel und B. Lund (Bonn): Bakterien als Ursache allergischer Asthmaanfälle (Versuche mit Keimen aus der Klebsiella-Gruppe)

In zahlreichen klinischen Beiträgen wird darauf hingewiesen, daß zwischen dem Bronchialasthma und Infektionen der Atemwege enge Beziehungen bestehen. Kämmerer fand, daß bei 56,5% seiner Asthmapatienten eine akute infektiöse Erkrankung der Respirationsorgane den ersten Anfall unmittelbar auslöste. Problematisch ist, ob die Infektionserreger — vor allem Bakterien — *primär sensibilisieren und anschließend die Anfälle auslösen*, ob sie nur Wegbahner für andersartige Antigene sind oder als Entzündungserreger unspezifisch das Auftreten von Asthmaanfällen fördern. Soll die Annahme einer direkten asthmaerzeugenden Wirkung begründet erscheinen, so muß nachgewiesen sein, daß Bakterien 1. direkt sensibilisieren und 2. allergische Reaktionen vom „Soforttyp" oder „anaphylaktischen Typ" erzeugen. Ihre Befähigung, sensibilisierend

zu wirken, steht außer Zweifel; ihr Vermögen, nach direkter Sensibilisierung allergische Sofortreaktionen auszulösen, ist aber unsicher, denn in der Regel verursachen Bakterien allergische Krankheitssymptome vom „Spätreaktionstyp" oder „Tuberkulintyp".

Die Frage, ob Bakterien *allergische Reaktionen vom Soforttyp* erzeugen können, ist tierexperimentell von Rosenau u. Anderson, Kraus u. Doerr, Tomcsik und vielen anderen bearbeitet worden. Die Ergebnisse sind unterschiedlich. Nur den früheren Untersuchern, z. B. Rosenau u. Anderson, Kraus u. Doerr, gelang es, durch direkte Sensibilisierung eine anaphylaktische Reaktionsbereitschaft hervorzurufen. Ihre Resultate konnten später, z. B. von Tomcsik, nicht wiederholt werden; in jüngeren Veröffentlichungen wird über Schockversuche nach passiver Sensibilisierung berichtet, einem Verfahren, das für die Aufklärung der Pathogenese des Infektasthmas nur begrenzten Wert hat.

Der *spezielle* Versuch, nach direkter Sensibilisierung mit Bakterien *allergische Asthmaanfälle* auszulösen, ist noch nicht gemacht worden.

Die Frage nach der Rolle der Bakterien beim Bronchialasthma wird daher von Unger für noch unbeantwortet gehalten. Nach Benson ist die Überempfindlichkeit gegen Bakterien, wie sie beim Asthma auftritt, von anaphylaktischen Erscheinungen grundsätzlich verschieden.

Im folgenden wird über eigene tierexperimentelle Untersuchungen zur Frage, ob Bakterien als primäres Allergen Asthmaanfälle hervorrufen können, berichtet. Die Versuche wurden an 360 Meerschweinchen durchgeführt.

Bei der Versuchsanordnung wurde die Pathogenese des menschlichen Infektasthmas soweit wie möglich nachgeahmt: Zur Sensibilisierung und bei Versuchen, Asthmaanfälle auszulösen, wurden Keime der Klebsiella-Gruppe Typ 2 verwandt, die vom Menschen isoliert worden waren und den Vorzug boten, in vollsynthetischem eiweißfreiem Nährboden züchtbar zu sein. Durch vorsichtiges Abtöten bei 60° C, mit Phenol oder Formol wurde ihre Struktur möglichst vollkommen erhalten. Einige Versuche wurden auch mit lebenden und durch Ultraschall zertrümmerten Bakterien durchgeführt. Die Sensibilisierung erfolgte durch wiederholte i.p. Injektion von abgetöteten Keimen. Die Injektionsflüssigkeit enthielt im Kubikzentimeter 1,68 mg oder 16,8 mg Trockensubstanz. 0,25, 0,5 oder 1 cm^3 wurden bei der Einzelinjektion verabfolgt. Asthmaanfälle wurden durch Inhalation von abgetöteten oder lebenden Bakterien provoziert.

Die Inhalation der Bakterien führte bei 11% der Sensibilisierten zu allergischen Asthmaanfällen. Der erste Asthmaanfall zeigte sich in der Regel erst beim 3. oder 4. Inhalationsversuch. Tiere, bei denen abgetötete Bakterien Asthma hervorriefen, reagierten auch auf die Inhalation von lebenden Klebsiellen mit Anfällen. Die Inhalation von lebenden Staphylokokken blieb aber wirkungslos; unbewachsenes oder von Bakterien befreites Nährmedium löste ebenfalls keine Anfälle aus.

Die asthmogene Potenz der einzelnen Bakterienpräparate war trotz der unterschiedlichen Abtötungsweise recht gleichartig. Bei der Sensibilisierung mit substanzreicheren Präparaten wurde etwa der gleiche Prozentsatz asthmabereiter Tiere erhalten wie bei der Verwendung der weniger substanzreichen Bakterienaufschwemmungen. Nach der Injektion

der substanzreichen Zubereitungen erlag aber ein erheblicher Prozentsatz der Tiere der Giftwirkung der Klebsiellen. Besonders toxisch waren die mit Ultraschall hergestellten Präparate, ohne eine entsprechend verstärkte Antigenwirkung zu besitzen.

Die Asthmaanfälle konnten durch Inhalation von N-Isopropylnoradrenalin beseitigt werden. Sie unterschieden sich im Grundsätzlichen nicht von Asthmaanfällen, wie sie uns von Hühnereiweiß-allergischen Meerschweinchen bekannt sind. Nur im Einzelnen zeigten sich Differenzen. Die Tiere hatten eine geringere Asthma- und Schockbereitschaft, im Anfall trat der Bronchialkrampf zugunsten der vermehrten Dyskrinie

Tabelle 1. *Prüfung der Asthmabereitschaft gegenüber lebenden und abgetöteten Klebsiella-Bakterien, lebenden Staphylokokken und* SIMMONS-*Citrat-Lösung*

Tier Nr.	Inhalation von: Klebsiella abgetötet	Klebsiella abgetötet	Klebsiella abgetötet	Klebsiella abgetötet	Klebsiella abgetötet	Klebsiella lebend	Citrat-Nährlösung	lebende Staphylokok.	Klebsiella lebend	Klebsiella abgetötet	Klebsiella abgetötet	Klebsiella lebend	Klebsiella lebend
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.
301	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
304	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—
323	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—
326	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+
330	—	—	—	—	+	+	—	—	—	+	—	—	
419	—	—	—	—	+	gestorben							
insges.	0	0	1	3	4	3	0	0	1	3	2	3	2

zurück; gelegentlich traten Spätreaktionen auf. Die Tabelle demonstriert den Verlauf wiederholter Asthmaversuche bei einigen der erfolgreich sensibilisierten Tiere. Die Provokation von Asthmaanfällen wurde bei ihnen im Zeitraum von mehr als 3 Monaten 13mal mit wechselndem Erfolg wiederholt. Ein Tier reagierte bei jedem Versuch mit Asthma, die anderen unregelmäßig nach größeren oder kleineren Intervallen. Die Asthmabereitschaft bleibt wesentlich länger bestehen, als aus der Tabelle ersichtlich ist; bei einem Tier konnten 7 Monate lang immer wieder Asthmaanfälle ausgelöst werden.

So erbrachten die Untersuchungen den Nachweis, daß Klebsiella Typ 2 nach aktiver Sensibilisierung beim Meerschweinchen allergisches Asthma hervorrufen kann. Das anaphylaktogene Antigen scheint ein unlöslicher Bestandteil des Bakterienleibes zu sein, der in der Grenzphase vorkommt.

Ob andere Bakterienarten bei einem höheren Prozentsatz der Versuchstiere Asthmabereitschaft hervorrufen, ob sich mit ihnen so viele positiv reagierende Tiere gewinnen lassen, daß man an ihnen weitere Probleme der Pathogenese und Therapie des Infektasthmas studieren kann, bleibt abzuwarten.

E. Kreppel (Bonn) und H. F. Zipf (Berlin-Dahlem): Untersuchungen zur Dämpfung und Ausschaltung der Lungensensibilität

Die intravenöse Injektion von Lokalanaesthetica führt zu einer Dämpfung der Impulsaussendung innerer sensibler Receptoren. Der Nachteil der gebräuchlichen Lokalanaesthetica ist ihre kurze intravenöse Wirkungsdauer von wenigen Minuten. Dieses gilt für die klinische Anwendung, wie für den Tierversuch. Unser Ziel war es deshalb, Körper ausfindig zu machen, die eine größere Haftfähigkeit an den Strukturen der sensiblen Endapparate besitzen.

Methodisch leiteten wir mit einem vereinfachten Verfahren vom Halsvagus des künstlich beatmeten Meerschweinchens die Aktionspotentiale der Lungenreceptoren ab. Die efferenten Impulse waren durch Vagotomie ausgeschaltet. Die künstliche Beatmung sicherte eine gleichbleibende Dehnung der Lungen.

Auf diese Weise untersuchten wir eine Reihe nicht-ionogener Netzmittel aus der Gruppe der *Alkyl-Polyglykoläther*, die physikochemisch durch eine hydrophile Polyglykolkette einerseits und ein lipophiles Radikal andererseits charakterisiert sind. Mit ihnen gelang es erstmalig, eine länger anhaltende Dämpfung bzw. Ausschaltung der afferenten Impulstätigkeit des Lungenvagus zu erzielen. Über sonstige pharmakologische Ergebnisse mit einer Reihe von Stoffen aus dieser Gruppe haben Soehring und Mitarbeiter berichtet. An dieser Stelle soll lediglich die prinzipielle Wirkung dieser Stoffklasse an Hand einiger Beispiele demonstriert werden.

Bei dem einen Stoff handelt es sich um *Dodecyl-Polyglykoläther* (Do R 9) bei dem der Dodecylalkohol mit durchschnittlich 9 ätherartig verbundenen Glykolmolekülen verknüpft ist.

Nach intravenöser Gabe von 15 mg/kg Do R 9 tritt eine ausgeprägte Dämpfung der atemsynchronen Impulstätigkeit der Lungenreceptoren ein. Erst nach etwa 2 Std ist das Ausgangsbild wieder erreicht. Eine weitere Steigerung der Dosis führt zur völligen Ausschaltung der Lungensensibilität. Die Lungenreceptoren stellten ihre Impulstätigkeit völlig ein, ein Zustand, der gleichsam einer „*pharmakodynamischen Durchschneidung*“ *des afferenten Lungenvagus* entspricht. Die intravenöse Grenzdosis liegt bei 0,5 mg/kg, also verhältnismäßig tief. Do R 9 ist etwa 2—3mal intensiver wirksam als Procain. Darüber hinaus ist die Wirkung je nach Dosis 10—30mal länger anhaltend.

Leichter als die normal tätigen Dehnungsreceptoren lassen sich die durch 100 γ/kg Veratrin. sulf. hervorgerufenen Dauerentladungen der Lungenreceptoren dämpfen. Hier zeigt Do R 9 eine intensivere Wirkung als Procain.

Analoge Bilder lassen sich übrigens an Herzvagusästen der Katze gewinnen. Die Veratrin-bedingte Dauerentladung der Herzreceptoren wird durch 5 mg/kg Do R 9 völlig beseitigt.

Allen von uns untersuchten Alkyl-Polyglykoläthern war — im Vergleich zu den Lokalanaesthetica im engeren Sinne — der langsamere Wirkungseintritt gemeinsam. Das Wirkungsoptimum wurde etwa nach

3—5 min erreicht. Die akute intravenöse Toxicität von Do R9 entsprach nach den Untersuchungen von Soehring, sowie Zipf und deren Mitarbeitern im ganzen gesehen etwa der des Procains. *Bei annähernd gleicher Toxicität und gleicher Dosierung wirkt dieser Stoff somit intravenös 2—3mal so intensiv und über 10mal so lange.* Inwieweit über diese pharmakologische Möglichkeit einer lang anhaltenden Dämpfung sensibler Organreceptoren hinaus eine therapeutische Anwendung in Frage kommt, soll durch die klinische Untersuchung entschieden werden.

Diskussion. Soehring (Hamburg): Die lang anhaltende Ausschaltung des Bezold-Jarisch-Effektes durch Do 9 wird nach Befunden von Soehring u. Frahm voll bestätigt.

Hinweise auf das Problem der Herzrezeptorenausschaltung und auf die Oberflächenaktivität von Do 9, die wegen der Schaumbildung möglicherweise bei therapeutischen Infusionen störend wirkt.

Zipf (Berlin-Dahlem): Die geschilderte Stoffgruppe besitzt drei bemerkenswerte Eigenschaften:

1. Sie ermöglicht zum erstenmal die völlige Ausschaltung der Lungensensibilität.
2. Sie besitzt endo-anaesthetische Wirkungen von bisher nie beobachteter Dauer (20—30mal so lange anhaltend wie Procain).
3. Es handelt sich um den Typ der Anaesthesia katelektrotonica, die mit diesen Stoffen z. B. an Haut und Schleimhäuten gezeigt werden kann. Bei intravenöser Anwendung in wirksamen Dosierungen (ab 0,5 mg/kg i.v.) fehlt das Reizstadium. Auch Muskelkontrakturen (Erregungs-) lassen sich auslösen und durch Vorbehandlung mit dem Anelektrotonicum Procain völlig verhindern.

Ausgedehnte sonstige pharmakologische Untersuchungen hat Soehring mit seinem Mitarbeiterkreise durchgeführt.

Wiegershausen (Berlin-Buch): Wir haben hier einen Stoff vor uns, der neben seiner eigentlichen pharmakodynamischen Wirkung oberflächenaktive Eigenschaften besitzt. Letztere bedingen eine bessere Resorption und stärkere Haftfähigkeit. Diese Beobachtung haben wir mit dem kreislaufwirksamen p-Oxyphenylmethylaminoäthanol machen können, wenn man anstelle des weinsauren Säureesters das Molekül mit der Cholsäure, einem capillaraktiven Stoff, verbindet. Bei i.v. Applikation an der Katze zeigen p-Oxyphenylmethylaminoäthanol-äquivalente Dosen des Tartrats und Cholats den bekannten Blutdruckanstieg, der jedoch bei der Cholatverbindung fast doppelt so stark in bezug auf Intensität und Dauer ist. Dieser Effekt ist nur mit der Verbesserung der Resorption durch das oberflächenaktive Cholat zu erklären. Cholsäure selber macht keinen Blutdruckanstieg.

Schlußwort. Kreppel zu Soehring: Hinsichtlich der therapeutischen Anwendung dieser Stoffgruppe zur Ausschaltung der Herzreceptoren an einem stark geschädigten Herzen möchten wir vorläufig noch zurückhaltend sein. Wir denken zunächst an die Lungenembolie als Indication, darüberhinaus an eine allgemeine Dämpfung von Reflexmechanismen.

Zu Zipf: Inzwischen haben wir in Bonn weitere endoanaesthetisch wirksame Körper vom Typ der Katelektrotonica untersucht. Bei ihnen finden wir fließende Übergänge von einem stark ausgeprägten „Dolorosa-Stadium" wie beim Veratrin, bis zu dem schleichenden Depolarisationsvorgang von Do R9. Trotz intensiver Bemühungen konnten wir bei diesem Stoff elektrophysiologisch keinen Anhalt für eine gesteigerte Receptorenentladung nachweisen.

D. Krause (Hannover): Antagonismus von Parasympathicolytica gegenüber der elektrischen Vagusreizung am Hundedarm

Die von Bayliss u. Starling sowie Cushny und neuerdings von Vogt u. Wick festgestellte *Atropinresistenz des Darmes* gegenüber der elektrischen Vagusreizung hat zu erheblichen Zweifeln an der cholinergischen Natur der postganglionären parasympathischen Fasern im Darm geführt. Im Widerspruch zu den genannten Autoren stehen die Befunde von Straub am Meerschweinchendarm „in situ", von Greeff am Magen-Vaguspräparat und von Harrison u. McSwiney am Katzenmagen; hiernach ist der Effekt der Vagusreizung atropinempfindlich.

Eigene Versuche zur Klärung der Widersprüche, die sich über mehrere Jahre erstreckten, führten lediglich zu der Erkenntnis, daß kurz dauernde *Reize mit hoher Frequenz* (30—50 Hz) wegen ihrer starken Wirkung auf Kreislauf, Atmung und intraabdominalen Druck sowie wegen des „escape" für die Untersuchungen *am Darm wenig brauchbar sind.*

Die von Greeff 1954 mitgeteilten Ergebnisse gaben Veranlassung zu einer neuerlichen Versuchsreihe an Hunden in Chloralose-Narkose, wobei neben dem Blutdruck die Darmbewegungen mit einer Ballonsonde aus dem nicht abgebundenem Duodenum registriert wurden. — Die elektrische Reizung der peripheren Vagusstümpfe am Hals erfolgte als Dauerreizung (5—10 min) in Anlehnung an das von Lendle, Mercker u. Rohr beschriebene Verfahren. Mit dieser Methodik (1—3 rechteckförmige Impulse pro Sekunde, 5—20 mA, 5—10 msec) gelingt es, am Kreislauf und am Darm einen gleichmäßigen und über 5—8 Std einwandfrei reproduzierbaren „vagotonen" Zustand einzustellen. Auf die Tatsache, daß zur Erregung des Darmvagus eine längere Impulsdauer notwendig ist, als zur Erregung des Herzvagus, wird besonders hingewiesen.

Als Parasympathicolytica wurden geprüft: *Atropin* (*A*), *Epidosin* (*E* = Phenylmethylvaleriansäure-β-diäthylaminoäthylesterbrommethylat) und *Buscopan* (*B* = Hyoscin-N-butylbromid). — Um einen Überblick über die Relation zwischen cholinolytischer und parasympathicolytischer Wirkung zu gewinnen, wurde auch der Antagonismus gegenüber i.v. Injektionen von 2—3 γ/kg Doryl (Carbaminoylcholin) untersucht.

Die *parasympathicolytische* Dosis der drei Lytica am Darm war annähernd gleich: 0,05 mg/kg führten zu einer sicheren Reduktion des Reizeffektes auf 0—40% des Ausgangswertes, 0,1 mg/kg zu einer Auslöschung. — Am Kreislauf waren A. und B. schon in geringerer Dosis (0,025 mg/kg) wirksam, während B. sich am Kreislauf etwas schwächer zeigte, als am Darm. Der Effekt von E. und B. war rasch (innerhalb von 10—30 min) reversibel, während sich bei Atropin frühestens nach 2 Std eine Restitution des Effektes der Vagusreizung zeigte.

Die *cholinolytische* Dosis von A. und E. betrug am Kreislauf wie am Darm 5—10 γ/kg: B. zeigte erst bei Dosierungen von 0,075—0,1 mg/kg eine annähernd äquivalente Wirkung.

Die Ergebnisse beweisen, daß auch der *Darmvagus atropinempfindlich* ist: sie stützen die Annahme, daß Acetylcholin auch im Bereich des

Darmes als Überträgerstoff der postganglionären parasympathischen Fasern anzusehen ist. Die bei A. und E. festgestellte Differenz zwischen parasympathicolytischer und cholinolytischer Dosierung, die auch am Kreislauf besteht, wird im Sinne der Theorie von Dale u. Gaddum erklärt. Hiernach ist der bei Nervenreizung „gezielt" freigesetzte Überträger schwieriger vom Receptor zu verdrängen als ein auf dem Blutweg zugeführter Stoff, der genau so wie das Lyticum durch Diffusion zu den Receptoren gelangen muß. Das Fehlen einer signifikanten Differenz zwischen cholinolytischer und parasympathicolytischer Dosis beim B. ist — wie auch die relativ starke Darmwirkung —, als Bestätigung der Auffassung von Wick zu werten, wonach der Substanz eine wesentliche *Wirkung auf parasympathische Ganglien* zukommt.

Diskussion. Vogt (Göttingen): Wie vereinbart sich die Vorstellung von extrinsic und intrinsic Acetylcholin mit der Vorstellung von der Verbindung: Wirkstoff-Receptor? Läßt man ACH von außen einwirken, so zeigt die eintretende Wirkung an, daß es am Receptor sitzt, an der gleichen Stelle und ebenso dicht wie das intrinsic ACH, das etwa nach Vagusreiz frei wird. Trotzdem wird die Wirkung des extrinsic ACH durch Atropin unterbrochen, die des intrinsic nicht oder schwer. Die Differenzierung extrinsic-intrinsic scheint daher nicht plausibel für die bestehenden Unterschiede.

Schlußwort. Krause: Es ist wahrscheinlich, daß beim „humoralen" ACH-Spasmus nicht alle Receptoren, sondern nur die leicht erreichbaren „äußeren" beeinflußt werden. Die Ergebnisse von Greeff liefern Beweismaterial für diese Hypothese.

H. Breuninger (Tübingen): Zur Differenzierung zentraler Sympathicolyse an der Ratte

Bei vorausgegangenen Untersuchungen über eine zentral gesteuerte Notfallfunktion am Blutdruck bei Veränderung der Kerntemperatur hatte es sich gezeigt, daß Substanzen mit sonst sehr differentem Angriffspunkt im ZNS eine auffallend kongruente Wirkung zeigten. Die Untersuchungen wurden auf weitere vegetative Reaktionen (Protrusio bulbi, Temperaturregulation) sowie auf die Stoffwechselreaktion des Blutzuckers ausgedehnt, außerdem wurden weitere „Notfallreize" (Hypoxie und Unterdruck) mit einbezogen.

Methodik

1. Blutige Messung des Blutdrucks in der linken Carotis der Ratte in Urethannarkose (1 g/kg s.c.), dabei gleichzeitig
2. Messung der Protrusio bulbi am rechten Auge desselben Tieres durch einen auf einer Blattfeder angebrachten Dehnungsmeßstreifen, dessen Verbiegung über einen Spiegelgalvanometer registriert wurde.
3. Der Blutzucker wurde an der nicht narkotisierten Ratte nach Bang in Abständen von 10–30 min bestimmt (Blutentnahme am Schwanz).

4. Die Unterdrucktoleranz wurde an Mäusen geprüft. Dabei wurde in einer Unterdruckkammer der Atmosphärendruck pro Minute um 25 mm Hg reduziert und dabei das erste Auftreten von Krämpfen als Kriterium für die Unterdrucktoleranz gewertet.

5. Die Beeinflussung der Thermoregulation wurde am Meerschweinchen bei einer Milieutemperatur von 22—24° C und von 0—5° C durch Messen der Rectaltemperatur mit dem Quecksilberthermometer untersucht.

Geprüfte Reize

a) Akute Hypoxie wurde durch Inhalation von Stickstoff über eine Trachealkanüle unter CO_2-Bindung im geschlossenen System über die Dauer von 25 sec hervorgerufen. Zur Beobachtung der Blutzuckerveränderung auf Unterdruck wurden Ratten über die Dauer von 30 min in eine Unterdruckkammer von +320 mm Hg gebracht.

Tabelle 1

Pharmakon Dosierung i. v.	Blutdruckreaktion		Hypoxie		1 γ Adrenalin i.v.		1 γ l-Noradrenalin i.v.
	Abkühlung	Anwärmung	Blutdruck	Protrusio bulbi	Blutdruck	Protrusio bulbi	Blutdruck
Phenyl-äthylbarbitursäure (Luminal 50 mg/kg)	H	H	H	H	0	0	0
Dimethylaminophenazon (Pyramidon 50 mg/kg)	H	H	S	S	S	0	S
Natrium salicylicum (0,2 g/kg)	0	0	S	0	S	0	S
1-Methyl-4-phenyl-piperidin-4-carbonsäure-äthylester (Dolantin 2 mg/kg)	H	H	H	H	0	0	0
Morphin. hydrochlor. (10 mg/kg)	0	0	0	0	0	0	0
Atropin. sulf. (5 mg/kg)	0	0	S	S	S	S	S
Ergotamin. tart. (1 mg/kg)	H	S	H	H	H	H	H
N-(3′-Dimethylamino)-propyl-3-chlorphenothiazin (Megaphen 5 mg/kg)	H	H	H	H	H	H	H
N-(2′-Dimethylamino-2′-methyl)-äthyl-phenothiazin (Atosil 10 mg/kg)	H	0	A	A	S	S	S
N-(2′-Diaethylamino-äthyl)-phenothiazin (Latibon 15 mg/kg)	A	0	A	A	0	0	0
2-(N-p-Tolyl-N-m-oxyphenyl amino-methyl)-imidazolin (Regitin 2 mg/kg)	H	H	H	H	H	H	H
NN-Dibenzyl-β-chlor-äthyl-amin-chlorhydrat (Dibenamin 20 mg/kg)	H	H	A	A	A	A	A

H = Hemmung, A = Abschwächung, S = Steigerung, 0 = keine Beeinflussung der Reaktionen.

b) Die Blutzuckerreaktion auf Wärme wurde an Ratten bei 3minütigem Aufenthalt in einem Thermostaten von 55° C beobachtet.

c) Die Blutzuckerreaktion auf Kälte wurde bei Ratten nach 7minütigem Aufenthalt in einem Wasserbad von 10° C untersucht.

Die geprüften Reaktionen wurden durch folgende Versuche als Notfallfunktionen charakterisiert:

Bei Inhalation von Stickstoff trat an der Ratte ein Blutdruckanstieg und eine Protrusio bulbi auf, wie dies am selben Tier nach intravenöser Injektion von etwa 1 γ/kg Adrenalin eintrat. Die gleiche Dosierung von l-Noradrenalin bewirkte einen ebenso großen oder häufig einen geringeren Blutdruckanstieg und keine oder nur minimale Protrusio bulbi. Die Erstickungsreaktion konnte mehrfach hintereinander im selben Ausmaße reproduziert werden. Am nebennierenlosen Tier trat die Reaktion an Blutdruck und Bulbus unmittelbar nach der Epinephrektomie in derselben Stärke auf, war aber bei Wiederholung der Einwirkung erschöpfbar; sie konnte nach 4—5 Std nicht mehr ausgelöst werden. Der Blutzuckeranstieg auf Kälte, Wärme und Unterdruck betrug etwa 20 bis 30 mg-% und erlosch sofort nach der Epinephrektomie oder Nebennierendenervierung. Auch bei künstlicher Zufuhr von Nebennierenrindenhormon zeigten sich diese Blutzuckerreaktionen nicht mehr.

Die Befunde über die Beeinflußbarkeit der Reaktionen sind in Tab. 1 u. 2 aufgeführt.

Bei den bei der Hypo- und Hyperthermie unwirksamen Ganglienblockern N,N,N′,N-3-Pentamethyl-N,N′, diäthyl-3-aza-pentylen-1,5-diammonium-dibromid (Pendiomid) und Pentamethylen-bis-(trimethylammonium)-dibromid (Penthonium) kam es bei einer Dosierung von

Tabelle 2

Pharmakon Dosierung s.c.	Blutzuckeranstieg			Senkung der Rectaltemperatur Milieutemperatur		Unterdrucktoleranz
	Kälte	Wärme	Unterdruck	22—24° C	0—5° C	
Luminal 50 mg/kg . .	A	A	H	+	+++	erhöht
Pyramidon 120 mg/kg	A	0	Eigenwirkung	+	+++	erhöht
Na. Salicyl. 0,2 g/kg .	0	0	0	+	—	normal
Dolantin 5 mg/kg . .	H	H	H	0	0	normal
Morphin. hydrochl. 10 mg/kg	0	H	0	+	+	erniedrigt
Megaphen 5 mg/kg . .	S	S	S	+	++	erniedrigt
Atosil 10 mg/kg . . .	0	0	0	+	+	normal
Latibon 15 mg/kg . .	0	0	0	—	—	—
Regitin 5 mg/kg . . .	A	A	A	—	—	erniedrigt
Dibenamin 10 mg/kg .	A	H	A	+	Gegenregulation	normal

10 mg/kg zu einer bemerkenswerten Abwandlung der Reaktion bei Hypoxie: Es war dabei die Protrusio abgeschwächt, während sich am Blutdruck ein länger anhaltender Anstieg von etwas geringerer Höhe einstellte.

Ergebnisse

1. Die sympathische Blutzuckerreaktion spricht am empfindlichsten an auf Reize, welche die Notfallfunktion auslösen und ist im allgemeinen schwerer hemmbar als die Kreislaufreaktion. Auch eine sichere periphere Sympathicolyse am Kreislauf braucht nicht von einer Dämpfung der Blutzuckerreaktion begleitet zu sein (z. B. Megaphen).

2. Bei der zentralen Sympathicolyse lassen sich folgende Wirkungstypen differenzieren:

a) „unspezifische" Hemmung im Rahmen einer tiefen Narkose,

b) vorwiegend „spezifische" Hemmung durch Dolantin, schwächer durch Megaphen,

c) Hemmung der thermoregulatorischen Vorgänge mit zentraler Sympathicolyse unter Pyramidon,

d) Hemmung der Thermoregulation ohne Sympathicolyse durch Morphin.

U. Trendelenburg (Oxford): Der sekundäre Blutdruckanstieg nach Histamin und Pilocarpin

Das Auftreten eines sekundären Blutdruckanstieges nach der intravenösen Injektion von Histamin oder Pilocarpin in Spinal- oder Chloralosekatzen ist ein Phänomen, das nicht völlig geklärt ist. Zweifellos ist eine Ausschüttung von Sympathin aus dem Nebennierenmark an dem Zustandekommen eines Blutdruckanstieges nach Histamin beteiligt[1], aber es müssen noch andere Faktoren verantwortlich sein[3]. Die Tatsache, daß Sympathicolytica das Auftreten des sek. Blutdruckanstieges nach Adrenalektomie verhindern, spricht für eine Freisetzung von Sympathin aus anderen Organen als den Nebennieren. Da kürzlich gefunden wurde, daß Histamin und Pilocarpin das obere Halsganglion der Katze zu reizen vermögen[4, 5], wurde untersucht, ob diese ganglionären Wirkungen an der Entstehung des sek. Blutdruckanstieges mit beteiligt sind.

An normalen und adrenalektomisierten Spinal- und Chloralosekatzen vermag Hexamethonium i.v. weder die Reizung des Halsganglions und des Nebennierenmarks durch Histamin und Pilocarpin noch den sek. Blutdruckanstieg zu mindern; dieser wird vielmehr verstärkt, und zwar parallel der nach Hexamethonium üblichen Steigerung der Empfindlichkeit des Blutdruckes gegenüber Adrenalin und Noradrenalin. Das Fehlen einer Abschwächung des Blutdruckanstieges

spricht gegen eine Mitbeteiligung der über die Pressoreceptoren ausgelösten Kreislaufreflexe, die durch Hexamethonium blockiert werden.

Entsprechend der Wirkung von Nicotin am Halsganglion und an den Nebennieren wird auch der sek. Blutdruckanstieg durch lähmende Dosen von Nicotin verhindert. — Bei Katzen mit intakten Nebennieren verstärkt Cocain den sek. Anstieg nach Histamin (20 γ). Dies steht in guter Übereinstimmung mit früheren Befunden[4, 5], daß Cocain die Reizung der Nebennieren durch Histamin nicht beeinträchtigt. Nach Adrenalektomie hemmt Cocain dagegen den sek. Blutdruckanstieg. Da Cocain die Wirkung von Histamin auf das obere Halsganglion blockiert[4, 5], wird gefolgert, daß i.v. injiziertes Histamin vorwiegend auf die Nebennieren wirkt und außerdem Sympathin durch Reizung sympathische Ganglien freisetzt.

Versuche mit Pilocarpin (100 γ) ergaben in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Root[2], daß die Nebennieren keine wesentliche Bedeutung für die Entstehung des sek. Blutdruckanstieges nach Pilocarpin haben können, denn Cocain hemmt den sek. Anstieg auch bei Tieren mit intakten Nebennieren. Intravenös injiziertes Pilocarpin scheint also vorwiegend auf sympathische Ganglien zu wirken, während den Nebennieren nur eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung des sek. Blutdruckanstieges nach Pilocarpin zukommt. Eine Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von Histamin und Pilocarpin wird darin gefunden, daß beide Substanzen am Halsganglion wirkungsgleich sind, während Histamin an den Nebennieren 50mal stärker wirkt als Pilocarpin[4, 5].

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß den kürzlich beschriebenen ganglionären Wirkungen von Histamin und Pilocarpin eine Bedeutung bei der Entstehung des sek. Blutdruckanstieges zukommt[6].

Literatur

[1] Burn, J. H., and H. H. Dale: J. of Physiol. **61**, 185 (1926). — [2] Root, M.: J. of Pharmacy a. Pharmacol. **101**, 125 (1951). — [3] Slater, J. H., and P. E. Dresel: J. of Pharmacy a. Pharmacol. **105**, 101 (1952). — [4] Trendelenburg, U.: Brit. J. Pharmacol. **9**, 481 (1954). — [5] Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 106 (1955). — [6] J. Physiol. **129**, 337 (1955).

Diskussion. Holtz (Frankfurt): Es bestehen Parallelen zu eigenen Versuchen mit Cholinestern, in denen die pressorische Wirkung des Milchsäureesters innerhalb eines bestimmten Dosierungsbereiches nach Ausschaltung der Nebennieren ausblieb, die des Brenztraubensäureesters dagegen nicht, so daß der eine eine größere „Affinität" zum Nebennierenmark, der andere zu den sympathischen Ganglien zu haben scheint.

Schmid (Heidelberg): An nicht narkotisierten Carotisschlingenhunden nach Wetzler u. Thauer fanden wir nach 1—2 γ Histamin pro Kilogramm regelmäßig sekundäre Blutdrucksteigerungen. Da das Minutenvolumen dabei reduziert und der

periphere Widerstand erhöht war, mußte entweder Ausschüttung von Arterenol oder eine Erregung der Ganglien bzw. des ZNS angenommen werden.

Schlußwort. Trendelenburg: Weitere Versuche, über die hier nicht berichtet werden konnte, zeigten, daß die sympathischen Zentren zweifellos an der Entstehung des sek. Blutdruckanstieges beteiligt sind. In der hier vorgetragenen Versuchsreihe wurden jedoch ausschließlich nicht narkotisierte Spinalkatzen oder mit Hexamethonium vorbehandelte Katzen unter Chloralosenarkose verwandt, um zentrale Einflüsse möglichst auszuschalten.

W. Vogt (Göttingen): Untersuchungen zur Natur von H-Substanzen

Durchströmt man den Darm von Meerschweinchen, die mit Pferdeserum oder Hühnereiweiß vorbehandelt wurden, mit antigenhaltiger Tyrodelösung, so läßt sich in der aus der Pfortader abfließenden Lösung neben Histamin eine weitere darmkontrahierende Substanz nachweisen, deren Wirkung durch Antihistaminica nicht verhindert wird. Diese bereits von mehreren Untersuchern in verschiedenen Organen beobachtete H-Substanz war bisher nur wegen ihrer am Meerschweinchendarm zögernd einsetzenden Wirkung als „slowly reacting substance" (SRS) beschrieben, aber nicht näher charakterisiert worden.

Eigene Versuche mit Meerschweinchendarm-Durchströmungsflüssigkeiten, die in 10-min-Perioden aufgefangen wurden (etwa 1 cm^3/min Durchfluß), ergaben, daß die nach Injektion von Antigen auftretende SRS durch Chymotrypsin abgebaut wird und somit Peptidnatur zeigt. Auf Grund der Herkunft der Substanz — Darmgewebe — war an Substanz P (v. Euler u. Gaddum) zu denken. Außerdem lag die Annahme nahe, daß es sich um Bradykinin (Rocha u. Silva) handelte. Diese beiden sehr ähnlich wirkenden Peptide lassen sich durch ihr verschiedenes Verhalten gegenüber salpetriger Säure und bei Verteilung zwischen n/5 NaOH und Butanol voneinander unterscheiden. Substanz P läßt sich nicht desaminieren und verteilt sich in alkalischem Medium stark zugunsten von Butanol, wogegen Bradykinin seine Wirkung durch Desaminierung verliert und sich nicht mit Butanol ausschütteln läßt. Die H-Substanz aus den Durchströmungsflüssigkeiten präparierter Meerschweinchendärme verhielt sich in diesen beiden Punkten wie Bradykinin.

Die Wirkung von SRS machte am isolierten Meerschweinchendarm etwa 10—20% der Gesamtwirkung der Durchströmungsflüssigkeiten aus, gemessen an der mit Bradykinin verglichenen Wirkungsstärke der Lösungen vor und nach Pyribenzaminbehandlung des Testdarmes. Im übrigen beruhte die Wirkung auf Histamin. Andere Stoffe, insbesondere Oxytryptamin, wurden nicht gefunden. Mit Chymotrypsin behandelte Lösungen waren am pyribenzaminbehandelten Meerschweinchendarm wirkungslos.

Der tatsächliche Gehalt der Schocklösungen an SRS dürfte in Wahrheit höher als gefunden liegen. Die Lösungen enthalten nämlich Fermente, die SRS rasch spalten. In Durchströmungsflüssigkeit gelöstes Bradykinin wurde bei 38° C innerhalb von 3 min zu 90% zerstört. Andererseits verging — durch Totraum in der Versuchsapparatur bedingt — vom Durchfluß der Tyrodelösung durch das Darmgewebe bis zu ihrem Auffangen und Testen (oder Konservieren durch Aufkochen) eine Latenzzeit von 1—1,5 min. Währenddessen konnten also beträchtliche Mengen Peptid abgebaut werden. Auch Histamin wird durch die Durchströmungsflüssigkeiten fermentativ zerstört, jedoch mit wesentlich geringerer Geschwindigkeit. Dadurch verschiebt sich das Verhältnis der beiden im Schock auftretenden Substanzen zugunsten von Histamin.

Zusammengefaßt handelt es sich bei der nach Antigen-Antikörperreaktionen im Meerschweinchendarm nachgewiesenen H-Substanz — slowly reacting substance — um ein Peptid, das sich gegenüber Desaminierung und bei Gegenstromverteilung wie Bradykinin und nicht wie Substanz P verhält.

D. Henschler (Würzburg): Zur Identifizierung von Cholinestern in biologischem Material

Das natürliche Vorkommen von anderen Cholinestern als Acetylcholin hat in jüngster Zeit erhöhtes Interesse gefunden. So konnten Erspamer u. Benati das Murexin als Urocanylcholin identifizieren, Whittaker und Mitarbeiter fanden in der Rindermilz neben Acetyl- auch Propionylcholin und einen weiteren, nach seiner Konstitution noch nicht aufgeklärten Cholinester. Holtz u. Schümann berichteten über das Vorkommen von Butyrylcholin im Rinderhirn. Augustinsson u. Grahn erhielten aus Extrakten von Bienenköpfen papierchromatographisch außer Acetylcholin zwei bisher nicht erkannte Cholinester. Dieser letztere Befund erweckte unser Interesse, da wir kürzlich in den Futtersäften, die von den Kopfdrüsen der Arbeiterbienen produziert werden, den ungewöhnlich hohen Acetylcholingehalt von 0,1% der nicht getrockneten Substanz fanden. Bei der Aufarbeitung dieses Futtersaftes nach Augustinssons Methode erhält man zwei chromatographisch trennbare Fraktionen, die sich bei der Anfärbung nach Whittaker und bei der pharmakologischen Auswertung wie Cholinester verhalten: die eine hat den gleichen R_f-Wert wie Butyrylcholin, die andere wie Acetylcholin. Eluiert man die dem Butyrylcholin entsprechende Fraktion und rechromatographiert unter gleichen Bedingungen, so läuft der größere Teil mit dem gleichen R_f, ein geringerer jedoch erscheint an der Stelle des Acetylcholins; bei wiederholter Rechromatographie und Elution läuft schließlich alles als Acetylcholin.

Zur Klärung dieses Verhaltens wurde eine Methode ausgearbeitet, kleinste Mengen von Estern des Cholins mit niederen Fettsäuren sicher an Hand ihrer Säurekomponenten zu identifizieren. Organextrakte werden papierelektrophoretisch bei Anwendung höherer Spannungen (20—30 V/cm) und langer Laufstrecken (bis 50 cm) auf breitem, freien Streifen präparativ aufgetrennt und nach Trocknung des Streifens mit HCl vom $p_H = 4$ eluiert. Aus den getrockneten Eluaten werden entsprechend dem Vorgehen von Hestrin durch alkalische Hydroxylaminlösung in kleinstem Volumen die Hydroxamate der Säuren dargestellt, diese nach Ansäuern mit HCl durch Eisentrichlorid in rotviolett gefärbte Komplexe übergeführt und aufsteigend chromatographiert (n-Butanol:Propanol:Wasser = 20:7:3, n-HCl, im Gemisch 0,2 m $FeCl_3$); das Papier wird mit einer 5%igen Lösung von $FeCl_3$ in salzsaurem Äther vorbehandelt. Das Verfahren ist gegenüber der Chromatographie der Alkalisalze sowie der Hydroxamate von Fettsäuren wesentlich empfindlicher und läßt die Säure aus 2×10^{-9} Mol eines Cholinesters noch sicher erkennen.

Aus Rinderhirn ließ sich mit dieser Methode neben Acetylcholin ein Cholinester isolieren, in dem sicher Buttersäure nachzuweisen ist; das Butyrylcholin konnte überdies durch Mikroschmelzpunktbestimmung des Golddoppelsalzes, die Base nach alkalischer Verseifung chromatographisch in drei verschiedenen Lösungsmittelsystemen als Cholin identifiziert werden. Unter Berücksichtigung der Verluste, die bei Aufarbeitung nach Zusatz bekannter Mengen von Butyrylcholin entstehen, läßt sich bei photometrischer Messung nach Hestrins Methode der Gehalt des Rinderhirns auf etwa 4 γ-% schätzen, der Acetylcholingehalt bei entsprechender Berechnung auf etwa 150 γ-%. Ob diesen geringen Mengen Butyrylcholin eine biologische Bedeutung zukommt, scheint uns zunächst zweifelhaft, da eine zufällige Bildung des Esters bei Gegenwart von Butyryl-Coenzym A, eventuell erst postmortal, durchaus möglich erscheint.

Literatur

Augustinsson, K.-B., u. M. Grahn: Acta physiol. scand. (Stockh.) **32**, 174—90 (1954). — Banister, J., V. P. Whittaker and S. Wijesundera: J. of Physiol. **121**, 55—71 (1953). — Erspamer, V., u. O. Benati: Biochem. Z. **324**, 66—73 (1953). — Gardiner, J. E., and V. P. Whittaker: Biochemic. J. **58**, 24—29 (1954). — Henschler, D.: Naturwissenschaften **41**, 142 (1954). — Hestrin, S.: J. of Biol. Chem. **180**, 249 (1949). — Holtz, P., u. H.-J. Schümann: Naturwissenschaften **41**, 306 (1954). — Whittaker, V. P., and S. Wijesundera: Biochemic. J. **51**, 348—51 (1952).

Ch. Stumpf und O. Kraupp (Wien): Über die Natur der neuromuskulären Lähmung von Hexamethylen-bis-carbaminoylcholin

In früheren Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß die Natur der neuromuskulär lähmenden Wirkung von Hexamethylen-bis-carbaminoylcholin (HBC) prinzipiell als Depolarisationslähmung vom Dekamethoniumtyp aufzufassen ist, da die für diesen Lähmungstyp charakteristischen Kriterien wie Kontrakturwirkung am Taubenmuskel und Froschrectus,

sowie die vermehrte Freisetzung von Kaliumionen aus der Skeletmuskulatur nach Applikation von HBC zu beobachten waren. Da jedoch in diesen Versuchen häufig zusätzliche Anzeichen einer curareartigen Lähmung (Herabsetzung der indirekten Erregbarkeit am Taubenmuskel. fehlende Kaliumfreisetzung aus der Skeletmuskulatur bei wiederholter Verabreichung von HBC) nachweisbar waren, wurde nunmehr in einer neuen Versuchsserie die Beeinflußbarkeit der HBC-Lähmung durch Prostigmin untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, daß die HBC-Lähmung an Ratten und Hunden durch nachfolgende Verabreichung von 25 μg/kg Prostigmin i.v. teilweise oder vollständig aufgehoben werden kann. Klinische Untersuchungen (H. Brücke, O. Mayrhofer) haben ergeben, daß ein HBC-Prostigmin-Antagonismus auch am Menschen nachweisbar ist. Dieser Antagonismus stellt einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein einer curareartigen Wirkungskomponente im Rahmen der HBC-Lähmung dar.

Nach Untersuchungen von Zaimis, Burns u. a., und Jenden u. a. entfaltet auch Dekamethonium nach einer primären Depolarisation eine gegenüber Acetylcholin kompetitive, curareartige Wirkung, wobei diese Wirkung — wie in bestimmten Versuchsanordnungen gezeigt werden kann — die Depolarisationslähmung zeitlich überdauert. Auch die Adsorptionsversuche von Fleckenstein u. a. kennzeichnen Dekamethonium als ein an der Grenze von depolarisierenden und depolarisationshemmenden Stoffen stehendes Relaxans. Unsere Untersuchungen über HBC dürften einen Hinweis dafür liefern, daß diese Substanz, in gleicher oder ähnlicher Weise wie Dekamethonium, eine depolarisierende und depolarisationshemmende Wirkungskomponente besitzt.

Literatur

Burns, B. D., and W. D. M. Paton: J. of Physiol. **115**, 41 (1951). — Fleckenstein, A., J. Eigler u. H. Bruch: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 483 (1955). — Jenden, D. J., K. Kamijo and D. B. Taylor: J. of Pharmacy a. Pharmacol. **111**, 229 (1954). Zaimis, E. J.: Nature (Lond.) **170**, 617 (1952). — J. of Physiol. **122**, 238 (1953).

G. Bornmann (Münster): Zur choleretischen Wirkung von Butylenglykol-Derivaten

Substitution von 1,3-Butylenglykol in 2- bzw. 2- und 4-Stellung durch Methyl- oder Äthylgruppen führte zu Verbindungen, die im Rattenversuch den Gallenfluß kräftig steigerten. Nach Eingabe von 5,0 cm^3/kg in den Magen ergab sich für 2,2-Dimethylpentandiol (2,2,4-Trimethylbutylenglykol) eine Steigerung um maximal 171%, für 2-Äthylpentandiol (2-Äthyl-4-Methylbutylenglykol) um 151%, für 2-Äthylbutylenglykol um

150%, für 2-Methylpentandiol (2,4-Dimethylbutylenglykol) um 154%, für 2-Methylbutylenglykol um 151% (Durchschnittswerte von je 5 Ratten, gemessen wurde die Tropfenzahl je Halbstunde). In gleicher Dosis erhöhte die als Vergleichssubstanz gewählte 20%ige wäßrige Lösung des dehydrocholsauren Natriums („Decholin") den Gallenfluß um 117%. Die Wirkung der Butylenglykol-Substitutionsprodukte fing fast gleich früh an wie die der Vergleichssubstanz, erreichte aber etwas später das Maximum und hielt länger an. Hinsichtlich der Qualität der Galle konnte aus Trockengehaltsbestimmungen abgeleitet werden, daß zwar eine Verdünnung der Galle unter dem Einfluß der Prüfsubstanzen eintrat, die je Zeiteinheit abgegebene Menge an Trockensubstanz aber dennoch deutlich erhöht war. Die Butylenglykol-Derivate wirkten auch nach intraduodenaler Zufuhr beim Meerschweinchen choleretisch, hatten dagegen praktisch keinen Effekt — im Gegensatz zur Vergleichssubstanz — beim Kaninchen; sie verhielten sich also ähnlich wie die Äther mehrwertiger Alkohole.

W. Rummel, H. Jacobi und K. Pfleger (Düsseldorf): Enterale Resorption kleinster Eisenmengen

Bei einem Schema in dem Review Artikel von Granick, das die augenblicklichen Vorstellungen über die Eisenresorption durch die Mucosazelle des Darmes wiedergibt, wird dem *Ferritin*-Apoferritinsystem für die Fe-Bewegung *innerhalb* der Zelle besondere Bedeutung beigemessen. Eine Frage bleibt unberührt, die mit Rücksicht auf die allgemeinen *Gesetzmäßigkeiten* der Zell*permeabilität* gestellt werden muß.

Wie kommt das Eisen — gleichviel in zwei- oder dreiwertiger Form — durch die praktisch *kationenundurchlässige* Membran überhaupt in die Zelle hinein? *Diffundiert* es langsam oder unterliegt es einem *aktiven* Transport, bei dem der Stoffwechsel und möglicherweise „Transporteure" (Carrier) eine wichtige Rolle spielen?

Wir haben bewußt mit sehr *kleinen* Fe-Mengen gearbeitet, — 5 γ Fe in einer 50 cm langen Darmschlinge bei der Katze —, damit die *treibende Kraft*, die ein höheres Konzentrationsgefälle darstellen würde, vernachlässigt werden kann. Unter diesen Bedingungen wird über 8 Std trotz Zugabe von Salzsäure (die zugeführte Lösung besitzt einen p_H von 2 bis 2,5), sowohl in vivo bei der Katze wie auch am isolierten Meerschweinchendarm *kein* Eisen *resorbiert*.

Das Eisen wurde zwar wie beim Arbeiten mit Fe^{59} üblich in dreiwertiger Form zugegeben; man hätte nach allgemeiner Anschauung erwarten dürfen, daß eine gewisse Menge in zweiwertige Form umgewandelt und dann resorbiert wird.

Wir stellten folgende *Arbeitshypothese* auf: Normalerweise steht mit dem Nahrungsbrei ein Überschuß von *Komplexbildnern* zur Verfügung; dabei könnten

solche, die wie *Aminosäuren* selbst einem *aktiven* Transport durch die Mucosa unterliegen, als Vehikel besonders geeignet sein, zumal gleichzeitig durch eine Chelatbildung die *Ladungen* des Eisens *abgeschirmt* werden und außerdem das Eisen daran gehindert wird, im alkalischen Milieu in nichtdialysierbare Eisenhydroxyde überzugehen.

Um die Brauchbarkeit dieser Hypothese zu erproben, untersuchten wir den *Einfluß* verschiedener *Komplexbildner* wie Cystein, Ascorbinsäure, Thiosulfat, Trilon B (Äthylendiamintetraessigsäure) und Citronensäure. Es ergab sich, daß erst nach einem Zusatz von Cystein die Fe-Resorption bei der Katze in Gang kommt. Das ist in vitro am Meerschweinchendarm genau so. Außer Cystein zeigte nur noch die Ascorbinsäure eine derartige Wirkung.

Man kann diesen Befund nun einfach damit erklären, daß durch die beiden Stoffe das Eisen in *zweiwertige* Form überführt und dadurch resorbierbar wird. Das ändert aber nichts an der Tatsache, daß bei dem benutzten *Überschuß* an Komplexbildnern Eisen *nicht frei* ionisiert vorliegt, sondern vorwiegend komplex gebunden ist. Außerdem wurde das Eisen auch durch *Thiosulfat reduziert* und dennoch *nicht* resorbiert, und schließlich kann auch Trilon — das nicht reduziert —, den Durchtritt am isolierten Darm ermöglichen.

Die *reduzierende* Wirkung scheint also — jedenfalls für die Penetration der Mucosa — *nicht alleine* ausschlaggebend zu sein. Vielmehr scheint die Fähigkeit — von Cystein beispielsweise —, Fe-Komplexe zu bilden, eine den Durchtritt begünstigende Eigenschaft zu sein.

Es war nun zu klären, ob Cystein als Chelatbildner lediglich die *Diffusibilität* verbessert oder ob darüber hinaus ein *stoffwechsel*abhängiger aktiver Transport mit im Spiele ist. Die Prüfung der *Temperaturabhängigkeit* des Fe-Durchtritts am isolierten Darm sollte hierüber Aufschluß geben.

Wie die Versuche bei 27° C zeigten, liegt der Q_{10} bei 3. Damit ist offenkundig, daß der Durchtrittsvorgang von einem *chemischen* Prozeß bestimmt wird.

Das Untersuchungsergebnis, die Förderung der Fe-Resorption z. B. durch Cystein als Aminosäure steht zwar im Widerspruch mit der neueren Literatur, die von nicht resorbierbaren Aminosäure-Fe-Komplexen spricht, vermag aber dafür eine alte Vermutung von Hoeber, die besagt, daß Eiweißbruchstücke an der Fe-Resorption beteiligt sind, zu unterbauen. Das Ausmaß der Temperaturabhängigkeit weist darauf hin, daß auch Eisen — vielleicht in ähnlicher Weise wie Kalium und Natrium — einem chemisch gesteuerten Transport unterliegt.

Im Hinblick auf diesen in Frage stehenden biochemischen Prozeß möchten wir für Cystein und Ascorbinsäure neben einer Funktion als Vehikel, die selbst einem aktiven Transport unterliegen, noch zwei

Möglichkeiten diskutieren: einen direkten Eingriff in metabolische Vorgänge in der Membran und eine Möglichkeit, die angesichts der Befunde von Mazur u. Mitarb. sehr viel Wahrscheinlichkeit besitzt, das ist die Überführung des dreiwertigen Ferritineisens in zweiwertige Form, wodurch das Abhängen des Eisens von Ferritin begünstigt wird.

A. Enders (Memmingen): Silberelimination nach experimenteller Argyrose

Die meisten Autoren halten die Argyrose für irreversibel. Es wurde versucht, die Frage experimentell zu klären. Als Versuchstiere dienten Ratten. Sie erhielten wäßrige Silberlösungen mit dem Futterbrei vermengt. Die Futtermengen wurden so knapp gehalten, daß in 24 Std jeweils die gesamte Futtermenge, d. h. auch die gesamte zugewogene Silbermenge verzehrt war. Als Test für die Argyrose diente die histologische Untersuchung von Duodenum, Leber und Niere (histologische Untersuchung von A. Moench, Freiburg).

Bei vergleichenden Versuchen mit Argentum nitricum und kolloidaler komplexer Acetyltannin-Silbereiweißlösung bewirkten beide Substanzen in gleicher Weise eine Argyrose in den genannten Organen. Argentum nitric. erzeugte jedoch eine Nephrose in den Nieren, die bei Verwendung von Acetyltannin-Silbereiweißlösung nicht auftrat. Bei Kontrollversuchen mit einem Gemisch von Natrium-, Kalium- und Calciumnitrat entstand ebenfalls eine Nephrose; diese wurde also durch die Nitrationen, nicht durch die Silberionen erzeugt. Bei den weiteren Versuchen zur Erzeugung einer experimentellen Argyrose wurde daher nur noch Acetyltannin-Silbereiweiß verwendet. Die angegebenen Dosen beziehen sich auf den Silbergehalt. Die Verfütterung von 1,5 mg Silber pro Tag und Kilogramm führte in 2 Wochen nur zu einer Argyrose des Duodenums. Erst Dosen von 6 mg Silber pro Tag und Kilogramm, 12 Wochen lang verfüttert, bewirkten auch eine deutliche Silberimprägnation in Leber und Niere. Bei einer Applikationsdauer von 24 Wochen bewirkte die reduzierte Dosis von 0,24 mg Silber pro Tag und Kilogramm eine ähnlich starke Argyrose in Leber und Niere.

Bei den Versuchen über ein eventuelles Verschwinden dieser Silberimprägnation erhielten die Ratten 12 Wochen lang 6 mg Silber pro Tag und Kilogramm. Nach Abschluß dieser Verfütterungsperiode wurde ihnen eine Niere und ein kleiner Leberlappen zur histologischen Untersuchung operativ entfernt. Sie wurden dann 3 und 6 Monate lang silberfrei ernährt, getötet und die andere Niere und das restliche Lebergewebe histologisch untersucht. Es konnte so jeweils bei derselben Ratte der Zustand sofort nach der Silberverfütterung und der Befund nach einer anschließenden mehrmonatigen silberfreien Ernährung verglichen werden.

Nach 3 Monaten war der Silbergehalt von Leber und Niere deutlich reduziert. So war in der Leber die Grundmembran der Vene nicht mehr imprägniert, nur in den Kupfferschen Sternzellen und in den Endothelzellen der Zentralvenen fand sich noch Silber. Nach 6 Monaten war in sämtlichen Nieren und einem Teil der Lebern überhaupt kein Silber mehr festzustellen. In den anderen Lebern fanden sich nur Spuren einer Argyrose. Das Duodenum war bereits nach 3 Monaten völlig silberfrei. Zwar fehlt hier die bioptische Kontrolle, jedoch ist dieses Resultat weitgehend gesichert, weil das Duodenum im Vergleich zu Leber und Niere in sämtlichen Versuchen bereits bei geringeren Dosen und kürzeren Zeiten mit Silber imprägniert gefunden wurde. Die Versuche beweisen, daß bei Ratten in den inneren Organen die Argyrose nach relativ kurzer Zeit wieder verschwindet.

Diskussion. Heubner (Heidelberg): Der Begriff „Argyrose" scheint mir nicht identisch zu sein mit dem Begriff „Silberspeicherung". Argyrose bedeutet Ansammlung von Schwefelsilber in fibrösen und elastischen Fasern und Membranen. Dies braucht sehr lange Zeit. Ich bin nicht sicher, ob der Vortragende beide Erscheinungen scharf genug auseinanderhält. Bei Einheilung von Silbermetall bildet sich zunächst in den Körperzellen Chlorsilber und erst später Schwefelsilber, dessen Kriställchen entlang den Lymphbahnen transportiert werden.

Schlußwort. Enders: Im Gegensatz zu den von Heubner angeführten Befunden wurden von uns die Silberverbindungen oral gereicht. Die Imprägnierungen finden sich auch in den Grundmembranen der Venen und in den Nierentubuli der Markzone und nicht nur in den Zellen des RES. Es dürfte sich daher mindestens teilweise um eine echte Argyrose im Sinne Heubners handeln.

E. Schmid, M. v. Bubnoff und R. Taugner (Heidelberg): Zur Nierenausscheidung von organischem und anorganischem Phosphat beim Hund

Nach früheren Versuchen von Taugner u. Mitarb. an Katzen können bei Infusion von Phosphorsäure-Estern diese selbst wie auch hydrolytisch abgespaltenes Orthophosphat tubulär sezerniert werden. Zur Vermeidung modifizierender Einflüsse der Narkose und zum besseren Vergleich mit den amerikanischen Standardversuchen über die Orthophosphat-Ausscheidung führten wir nun zusammen mit Hochrein u. Dorschner *Clearance-Versuche mit Fructose-Diphosphat* (*FDP*) an drei dressierten, nicht narkotisierten Hündinnen durch. Dabei wurden Phosphat- und Creatinin-Clearance ermittelt sowie tubuläre Rückresorption bzw. Sekretion von organischem und anorganischem Phosphat in üblicher Weise berechnet.

Bei einem Tier ergab sich, neben Filtration und Rückresorption, kein Hinweis auf eine zusätzliche tubuläre Sekretion von *organischem Phosphat*. Beim zweiten Tier stieg dagegen das Verhältnis $\frac{\text{Clearance organ. P.}}{\text{Clearence Creatinin}}$ bei Plasmaspiegeln zwischen 8 und 14 mg-% auf 1.35 an, wobei die tubuläre

Sekretion von organischem Phosphat 5,4 mg P/min betrug. Auch beim dritten Tier fanden wir eine tubuläre Sekretion von organischem Phosphat.

Das gleichzeitige Vorkommen von Rückresorption und tubulärer Sekretion stellt eine Analogie zu der bisher in dieser Hinsicht einzigartigen Kalium-Ausscheidung dar. Die besonderen Beziehungen zwischen FDP-Ausscheidung und Plasmaspiegel weisen darauf hin, daß der Ausscheidungsmechanismus von FDP von dem anderer tubulär sezernierter Substanzen wie Penicillin, PAH usw. verschieden ist. Ein weiterer Unterschied liegt darin, daß die FDP-Clearance bei fallendem Plasmaspiegel wesentlich größer war als bei steigendem Angebot, ein Befund, der für eine tubuläre Speicherung von FDP zu sprechen scheint.

Bei Infusion von FDP war — im Gegensatz zu früheren Versuchen an Katzen — beim Hund keine tubuläre Sekretion von *Orthophosphat* nachzuweisen.

Vergleichende Versuche mit *Infusion von Orthophosphat* führten bei langsamer Steigerung der Plasmakonzentration zu Ergebnissen, die im wesentlichen mit denen von Pitts u. Alexander übereinstimmen: Die tubuläre Rückresorption stellte sich dabei auf annähernd konstante Werte, d. h. auf ein tubuläres Maximum ein. Nach rascher Infusion von Orthophosphat erreichte die tubuläre Rückresorption jedoch bei gleichen Plasmakonzentrationen dreimal höhere Werte. Dieser Unterschied war durch modifizierende Einflüsse des toten Raums nicht zu erklären. Da tatsächliche Unterschiede in der Rückresorption unwahrscheinlich sind, liegt die Annahme nahe, daß die Entstehung nichtfiltrierbarer Phosphate eine überhöhte Rückresorption vortäuscht. Eigenartigerweise scheint die Menge des dabei entstehenden nichtfiltrierbaren Phosphats weniger vom Plasmaspiegel als von der Infusionsgeschwindigkeit abzuhängen.

Literatur

Pitts, R. F., and R. S. Alexander: Amer. J. Physiol. **142**, 648 (1944). — Schmid, E., H. Ganz, W. Braun u. R. Taugner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 452 (1955). — Taugner, R., M. v. Bubnoff u. W. Braun: Pflügers Arch. **258**, 133 (1953).

Diskussion. Peters (Mainz): 1. Die Fructose-Diphosphat-Clearance lag nach den angegebenen relativen Werten bei 2 Hunden höher als die exogene Kreatinin-Clearance, bei einem Hund niedriger. Wie groß waren die absoluten Werte der exogenen Kreatinin-Clearance dieser 3 Hunde? Wurde untersucht, ob die exogene Kreatinin-Clearance beim Hund durch Fructose-Diphosphat beeinflußt wird?

2. Zur Deutung der geringen $PO^{4'''}$-Ausscheidung bei langsamer Infusion dieser Ionen nehmen die Vortragenden in Anlehnung an ältere Hypothesen die Bildung eines nicht filtrierbaren Phosphatkomplexes an. Haben Sie diesen Komplex nachweisen können oder neue Argumente zugunsten seiner Existenz beigebracht?

Schlußwort. Schmid: 1. Die Kreatinin-Clearance wird durch Fructose-Diphosphat nicht verändert. Die Kreatinin-Clearances betrugen 80—110 cm^3/min.

Die zweite Frage ist z. T. im Vortrag beantwortet. Weitere Versuche sind im Gang.

P. Stern, S. Huković und A. Misirlija (Sarajevo): Über die Ausscheidung des Adrenalin und Nor-Adrenalin bei Dystrophia musculorum progressiva

Meurer[17] zeigte, daß die Resektion des Sinus caroticus das klinische Bild der Dystrophia musculorum progressiva (Erb) (DMP) bedeutend bessert, Thevenand u. Mitarb[19] fanden dasselbe bei der Myasthenia gravis. Da die plötzliche Ausschaltung des Sinus caroticus eine gesteigerte Ausschüttung des Nor-Adrenalin (Nor) und Adrenalin (A)[3, 13, 15] zur Folge hat, so stellten wir uns die Frage, wie A und Nor im Urin von Patienten mit DMP ausgeschieden werden. Normal scheidet ein gesunder Mann etwa ein Drittel A und zwei Drittel Nor von der gesamten Catecholaminmenge aus. Wir bestimmten diese Catecholamine im Urin nach der Methode von Euler u. Hellner am Blutdruck der Katze und am Dickdarm des Huhnes[7]. Wir hatten Gelegenheit, 9 Fälle der DMP und 3 Fälle des Myasthenia gravis zu untersuchen. In allen erwähnten Fällen fanden wir eine erhöhte Menge A gegenüber Nor, in einigen Fällen betrug A sogar neun Zehntel der gesamten Menge der Catecholamine oder konnte Nor auch nicht in Spuren nachgewiesen werden. Die A-Menge steigerte sich um das zehn- bis sechzigfache in 24 Std. Der normale Mensch scheidet etwa 10 γ A und etwa 30 γ Nor aus. Bei unseren 9 Fällen DMP fanden wir als die kleinste Menge 87 γ A, als die größte Menge 600 γ A. Es stellt sich die Frage, ob diese erhöhte Ausscheidung von A, bzw. verminderte Ausscheidung von Nor die Ursache oder die Folge dieser Krankheit ist. Von Interesse ist, daß bei DMP auch eine stärkere Ausscheidung von Kreatin als Ausdruck einer stärkeren Methylierung stattfinden kann, obwohl nicht alle Autoren dieser Meinung sind, indem sie behaupten, daß die ausgeschiedene Kreatinmenge, mit Rücksicht auf die schwächere Kreatininausscheidung, noch nicht für eine Hypermethylierung sprechen würde[12]. Kinder zeigen normal schon eine Kreatinurie. Die gesteigerte A-Ausscheidung bei DMP muß jedenfalls eine stärkere Methylierung bedeuten, was mit der bekannten Tatsache übereinstimmt, daß bei DMP die Methylreserven des Organismus erschöpft sind[10]. Bekanntlich hat Ken Kuré bei verschiedenen Laboratoriumstieren mittels Entfernung des Sympathicus, und zwar in den überwiegend sympathisch innervierten Gebieten, oder des Parasympathicus[16] eine experimentelle DMP hervorrufen können, und zwar bei jungen Tieren leichter als bei älteren. Nach Sympathektomie verschwindet Nor vollkommen, während A in den Geweben immer noch nachweisbar ist[8], weil A hauptsächlich im Nebennierenmark, Nor hingegen an den adrenergischen Nervenendigungen ausgeschüttet wird[6]. Die Entfernung des Parasympathicus führt ebenfalls zu DMP, vielleicht infolge der Ausschaltung des dem cholinergischen Nervensystem eigenen trophischen Effektes.

Dies könnte vielleicht die Erzeugung der DMP bei Kaninchen mittels cholinarmer Diät erklären[14]. Es ist für unsere Betrachtungen sehr bedeutend, daß DMP einer Encephalitis folgen kann[4] und bekanntlich erzeugt die Reizung des Hypothalamus eine sehr gesteigerte Ausschüttung des A[2]. Meurer spricht von einer Dysfunktion des Diencephalon bei dieser Krankheit. Er erwähnt sogar die eventuelle Möglichkeit des Orbelischen Effektes nach Entfernung des Sinus caroticus infolge gesteigerter Nor-Ausschüttung. Wir sind der Meinung, daß bei DMP die stärkere Ausschüttung des A und der günstige klinische Effekt der Sinus-caroticus-Entfernung die Entstehung dieser Krankheit zumindest teilweise erklären können. Obwohl DMP nur selten als Folgeerscheinung der Encephalitis auftritt, so können wir uns vorstellen, daß andere Traumen auf das entsprechende Hypothalamusgebiet einwirken und eine erhöhte A-Ausschüttung auslösen können, worauf die Erschöpfung der Glykogenreserven im dystrophischen Muskel folgt[4]. Es sei weiter erwähnt, daß A allein, abgesehen von der DMP, eine Kreatinurie verursachen kann[18]. Diese Diskrepanz unserer Befunde und der erwähnten Tatsache von der DMP-Erzeugung mittels cholinarmer Diät, ferner der normalen Mengen der ausgeschiedenen Methylgruppen, in bezug auf das Verhältnis Kreatin-Kreatinin, sowie der günstige Effekt verschiedener Methyldonatoren auf das klinische Bild der DMP erlauben die Schlußfolgerung, daß es sich um eine selektive Störung der Methylierung, und zwar nur des Nor in A, handelt. Im akuten Versuch führt die Occlusion des Sinus caroticus zu gesteigerter Ausschüttung von Nor und A, bei totaler Entfernung handelt es sich wahrscheinlich nur um gesteigerte Ausschüttung von Nor, ohne A. Im akuten Versuch werden im Nebennierenmark der Katze bis zu 2000mal mehr Catecholamine ausgeschüttet als normal[3] und bekanntlich wird nur ein kleines Prozent der im Blute zirkulierenden Catecholamine im Urin ausgeschieden[5]. Demnach ist es nicht wahrscheinlich, daß der A-Gehalt des Blutes vor der Operation erhöht wird, wegen seiner intensiven metabolischen Effekte, sondern vermutlich nur der Nor-Gehalt. In diesem Sinne sprechen auch die Versuche von Meurer. Zuckerbelastungen vor der Operation zeigen eine tiefe Senkung des Blutzuckerspiegels, wahrscheinlich als Folge der durch A hervorgerufenen Insulin-Ausschüttung, während nach der Operation die Zuckerbelastungskurve normal erscheint. Nach unseren bisherigen Versuchen scheint es, daß der Thymus in der Methylierung des Nor in A eine wichtige Aufgabe hat. Wir konnten an über 50% der Ratten zeigen, daß Thymusextrakte, nach Bomskov[1] bereitet, den A-Gehalt der Nebenniere erhöhen[11]. Dieser Befund bringt uns auf den Gedanken, daß der Status thymicolymphaticus zu einem der DMP sehr ähnlichen Zustand führt, weil wegen höherer A-Mengen die Glykogenreserven aufgebraucht werden. In diesem Sinne wird auch die energetisch-dynamische Herzinsuffizienz, wie sie von

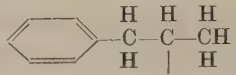
Gremels[9] aufgefaßt wird, in gewisser Hinsicht zu einer „Dystrophia progressiva myocardii". Im übrigen ist es bekannt, daß DMP immer von einer Herzmuskelschädigung begleitet wird[20]. Demnach also wirkt die gleich Noxe, d. h. A, auf die Skeletmuskulatur sowie auf den Herzmuskel, indem es den Sauerstoffverbrauch erhöht und die Glykogenreserven verbraucht. Einmal ist die Sympathicuswirkung zerstreut, die ganze Skeletmuskulatur und das Herz erfassend, anderenfalls begrenzt sie sich entweder nur auf das Herz oder nur auf eine Skeletmuskelgruppe.

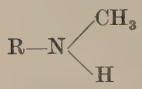
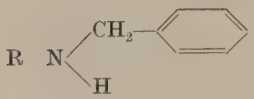
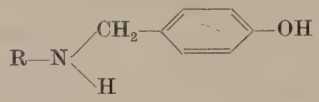
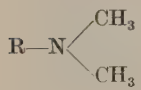
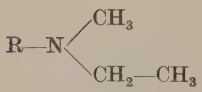
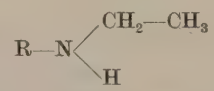
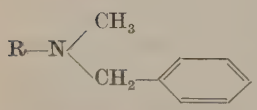
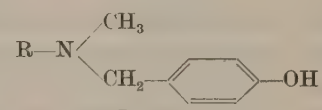
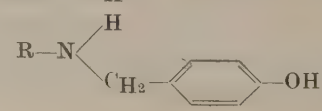
Literatur

[1] Bomskov, C., u. L. Sladovic: Dtsch. Z. Chir. **253**, 563 (1940). — [2] Brauner, F., F. Brücke et F. Kaindl: Arch. internat. Pharmacodynamie **81**, 357 (1950). — [3] Brauner, F., F. Brücke, F. Kaindl et A. Neumeyer: Arch. internat. Pharmacodynamie **83**, 505 (1950). — [4] Curschmann, H.: Handbuch der Neurologie XVI. Wien: Springer 1934. — [5] von Euler, U. S.: Pharmacol. Rev. **3**, 247 (1951). — [6] von Euler, U. S., C. Franksson u. J. Hellström: Acta physiol. scand. (Stockh.) **31**, 1 (1954). — [7] von Euler, U. S., u. S. Hellner: Acta physiol. scand. (Stockh.) **22**, 151 (1951). — [8] von Euler, U. S., u. A. Purkhold: Acta physiol. scand. (Stockh.) **24**, 212 (1951). — [9] Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **194**, 629 (1940). — [10] Handler, P., and W. J. Dann: J. of Biol. Chem. **146**, 357 (1942). — [11] Hillarp, N., and B. Hökfelt: J. of Histochem. a. Cytochem. **3**, 1 (1955). — [12] Hoagland, C. L.: Adv. Enzymol., Interscience Publichers, Inc. New York 1946. — [13] Holtz, P., u. H. J. Schümann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **206**, 49 (1949). — [14] Hove, E. L., and D. H. Copeland: J. Nutrit. **53**, 391 (1954). — [15] Kaindl, F., and U. S. von Euler: Amer. J. Physiol. **166**, 284 (1951). — [16] Kuré, K.: Klin. Wschr. **1938**, 1003. — [17] Meurer, H.: Dtsch. med. Wschr. **1950**, 753. — [18] Riesser, O.: Muskelpharmakologie. Bern: Hans Huber 1949. — [19] Thevenand, A., I. Leger et J. M. Marques: Presse méd. **1952**, 969. — [20] Zatuchni, J., E. E. Aegerter, L. Molthan and C. R. Shuman: Circulation (New York) **3**, 846 (1951).

K. Pfleger (Düsseldorf): Umwandlung von Aminen

Pharmakologisch wirksame Amine enthalten ein N-Atom, das bei den einzelnen Substanzen verschieden substituiert sein kann. Es interessierte uns nun, ob und wie der Organismus diese Substituenten verändern kann. Freundlicherweise stellte uns die Firma Temmler, Hamburg, einige einfach gebaute Abkömmlinge des Phenylisopropylamins zur Verfügung, deren Umbau wir dadurch studieren konnten, daß die Zwischenprodukte im Urin ausgeschieden werden. Die Substanzen wurden Ratten s.c. verabreicht, und die veränderten Produkte im Urin qualitativ und quantitativ papierchromatographisch bestimmt. Unsere Methode gestattete uns auch eine Unterscheidung von Verbindungen, die sich nicht ausreichend papierchromatographisch trennen ließen. Der Einfachheit halber seien in Tab. 1 die Formeln angegeben und der Prozentsatz des verabreichten Amins, der in der angegebenen Form im 24 Std-Urin aufgefunden wurde. Die Ausscheidungsprodukte, die eine phenolische OH-Gruppe besitzen, konnten

Tabelle 1 R = 

Gegebene Substanz	Im Urin aufgefundene Substanzen	% der gegebenen Dosis i dieser Form aufgefunde (auf Amin-N bezogen)
	unverändert	18,0
		8,4
	unverändert	0,5
		6,0
		2,0
	unverändert	2,0
		2,1
		1,2
	unverändert	5,3
		2,6
		2,6
		2,5
	unverändert	Spuren
		2,2
		0,4
		4,2

erst nach saurer Hydrolyse extrahiert werden. Sie liegen also in veresterter Form vor.

Der tierische Organismus ist somit in der Lage, beliebige Substituenten des Amin-N abzuspalten. Die Abspaltung von Methylgruppen vom N ist beschrieben. Allerdings wurde diese mit dem Begriff der Entmethylierung in Zusammenhang gebracht. Da aber auch Äthyl- und Benzylgruppen abgespaltet werden, handelt es sich hier um eine weit weniger spezifische Reaktion. In vorläufigen Versuchen konnten wir eine Abspaltung der Methylgruppen von Phenylisopropyldimethylamin im Gesamtleberhomogenat nachweisen. Welches Ferment für die beschriebenen Reaktionen verantwortlich ist, sollen weitere Untersuchungen klären.

Methodik

Übliche Extraktion im alkalischen (bei OH-Gruppen $p_H = 8{,}0$) mit Benzol, Ausschütteln aus Benzol in 2 cm³ n HCl.

Auftragen auf Schleicher & Schüll 2043b mit Agla-Mikrometerspritze.

Aufsteigende Chromatographie mit Isoamylalkohol-Ameisensäure-H_2O (40:10:50).

Qualitativer Nachweis

Alle Amine: Besprühung mit Dragendorfs Reagens.

Sek. Amine: Besprühung mit einer Lösung, die 2% Nitroprussid-Na, 2% Natriumnitrit in halbgesättigtem Na_2CO_3 enthält. Sofort nach Einhängen der Papierbogen in Acetaldehyddämpfe erscheinen sek. Amine als blaue Flecken.

Prim. Amine: Besprühung mit gleicher Lösung wie sek. Amine. Einhängen in Acetondämpfe. Nach 5 min braune Flecken.

Phenol. OH-Gruppen: Übliche Diazotierung auf Papier.

Quantitativer Nachweis

Papierchromatographische Trennung wie oben. Anschließend Lokalisation der Flecken mit Dragendorfs Reagens und Elution in 2—5 cm³ n/10 HCl 2 Std auf der Schüttelmaschine.

Gesamtamine: 1 cm³ Eluat + 0,5 cm³ n NaOH + 5 cm³ Benzol. Abzentrifugieren, 4 cm³ davon + 2 cm³ Benzollösung mit 625 γ Pikrinsäure. Ablesen bei 410 mμ. (Bei Phenol. OH-Gruppen alkalisieren mit $NaHCO_3$, 2mal mit 5 cm³ ausschütteln.)

Tert. Amine: Vorherige Behandlung des Eluates mit $NaNO_2$ (ansäuern).

Sek. Amine: 1 cm³ Eluat (Vergleichsküvette 1 cm³ n/10 HCl) + 1 cm³ 33% Acetaldehyd 2 cm³ Lösung wie für Sprühreagens für sek. Amine verwandt (möglichst schnell in beide Proben geben). Ablesen nach 3 und 4 min bei 615 mμ.

H. Mercker, W. Lochner und E. Schürmeyer (Göttingen): Die Wirkung vasoaktiver Pharmaka auf die Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes

Für die Beurteilung der Sauerstoffversorgung des Herzmuskels stellt die Sauerstoffsättigung des venösen Coronarblutes eine wichtige Größe dar. Ihre Messung kann dazu dienen, bei Gabe eines Pharmakons zu

prüfen, ob eine bessere oder schlechtere Sauerstoffversorgung des Herzmuskels resultiert. Pharmaka, denen eine Wirkung auf den Coronarkreislauf zukommt, können aber auch über einen Einfluß auf den peripheren Kreislauf und die Herzleistung den Blutdruck (und damit druckpassiv die Coronardurchblutung) und den Sauerstoffbedarf des Herzmuskels verändern. In der resultierenden Sauerstoffausnutzung des Coronarblutes kommt die Summation dieser verschiedenen Komponenten zum Ausdruck. Unter diesem Gesichtspunkt haben wir im Tierexperiment Pharmaka untersucht, denen eine Wirkung auf den Coronarkreislauf zugeschrieben wird.

Bei Hunden wurde venöses Coronarblut durch Katheter aus dem Coronarsinus bei geschlossenem Thorax gewonnen und die Sauerstoffsättigung photoelektrisch unter Benutzung des Oxymeters nach Kramer fortlaufend gemessen. Ferner wurden die arterielle Sauerstoffsättigung und der Blutdruck registriert.

Papaverin führte regelmäßig zu einem starken Anstieg der Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes bei fehlender oder geringer Blutdrucksenkung. Tonephin erniedrigte die Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes bei gleichzeitiger Blutdrucksteigerung. Nicotin erhöhte die Sauerstoffsättigung des Sinusblutes, vermutlich durch Erregung des Sympathicus und eine Adrenalinausschüttung. Euphyllin bewirkte im allgemeinen einen kurzfristigen Anstieg der Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes. Es kann jedoch die anfängliche Steigerung von einer Erniedrigung unter den Ausgangswert gefolgt sein. Hierbei spielt offensichtlich die häufig zu beobachtende Blutdrucksenkung eine Rolle. Auch Foltz u. Mitarb. beobachteten nach Aminophyllin (= Euphyllin) eine erhöhte arteriovenöse Sauerstoffdifferenz für das Coronarblut. Strophanthin und Coffein waren in unseren Versuchen ohne wesentlichen Einfluß auf die Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes. (Nur hohe Dosen von Coffein [10 mg/kg] bewirkten eine leichte Zunahme.) Effortil bewirkte eine mäßige Erhöhung der Sauerstoffsättigung des Coronarsinusblutes bei gleichzeitiger Blutdrucksteigerung.

Literatur

Foltz, E. L., A. Rubin, W. A. Steiger and P. C. Gazes: Circulation (New York) **2**, 215 (1950).

Diskussion. Kuschke (Bad Nauheim): Die coronarerweiternde Wirkung der Adrenalinkörper gilt allgemein als therapeutisch wenig geeignet, da sie mit einer Stoffwechselsteigerung einhergeht und keine Luxusmehrdurchblutung zustande kommt. Nach den vorgelegten Befunden einer starken Abnahme der art.-venösen O_2-Differenz nach Adrenalin scheint dem therapeutisch ungünstigen Faktor der Stoffwechselsteigerung bei der Adrenalinmehrdurchblutung keine so große Bedeutung zuzukommen.

Kraupp (Wien): Bei der pharmakologischen Untersuchung eines Monopurinderivates zeigte sich, daß diese Substanz bei i.v. Verabreichung gleichzeitig neben einer Steigerung der Herzfrequenz und des Coronardurchflusses zu einer starken

Herabsetzung der arteriovenösen Sauerstoffdifferenz führt. Diese Herabsetzung der AVD O_2 ist größer als nach der Durchblutungsänderung zu erwarten wäre.

Schlußwort. Mercker: Ob eine bessere O_2-Versorgung des Herzmuskels nach Adrenalingabe resultiert, wird von dem Verhältnis der eintretenden Mehrdurchblutung und dem O_2-Bedarf des Herzmuskels abhängen. Am innervierten Herzlungenpräparat wurde auch von Gollwitzer-Meier u. Mitarb. eine Zunahme der O_2-Sättigung des Coronarisnusblutes nach Adrenalin beobachtet.

Zu Kraupp: Verbindungen aus dieser Klasse wurden von uns nicht untersucht. Stoffwechselwirkungen am Herzmuskel können die Befunde erklären.

H. J. Kuschke und E. Paas (Gießen): Beitrag zur Wertbestimmung der gefäßerweiternden Wirkung des Khellin, vergleichende Untersuchung mit Papaverin

Die tierexperimentellen Befunde der Literatur über die Gefäßwirkung des Khellin ergeben das Bild einer Substanz mit bemerkenswert günstigen Eigenschaften. Khellin soll eine kräftige gefäßerweiternde Wirkung vorwiegend oder ausschließlich an den Coronargefäßen entfalten und dabei hinsichtlich Stärke und Dauer der Wirkung dem Papaverin überlegen sein, mit dem es den Angriffspunkt an der glatten Muskulatur gemeinsam hat. Indessen sind die klinischen Urteile über den therapeutischen Nutzen bei der Dauerbehandlung der Angina pectoris ebenso widersprechend wie über Papaverin und reichen vom Prädikat „Gut" bis zu „Wirkungslos".

Zur Überprüfung seines qualitativen und quantitativen Wirkungscharakters haben wir an Hunden mit der Thermostromuhr die Reaktion verschiedener Gefäßgebiete auf Khellin untersucht und seine Wirkungsstärke an den Coronargefäßen mit der des Papaverins verglichen. Khellin wurde mittels Dimethylformamid gelöst und in Dosen von 1 und 2 mg/kg, Papaverin in äquimolaren Mengen, injiziert. An den untersuchten Gefäßen Art. coronaria dextra, Vena femoralis, Vena portae und Vena cava thor. inf. führte Khellin in gleicher Weise zu einer Mehrdurchblutung, die meist mit einer kurzdauernden Blutdrucksenkung einherging. Qualitative Unterschiede zum Papaverin bestanden weder in der Blutdruckwirkung noch in der Wirkung auf die einzelnen Gefäßgebiete. Zur Bestimmung des quantitativen Wirkungsverhältnisses an den Coronargefäßen wurden Papaverin, Khellin und das Lösungsmittel jeweils im gleichen Versuch hintereinander injiziert und an Hand der maximalen prozentualen Durchflußsteigerungen nach Khellin abzüglich des Lösungsmitteleffektes und nach Papaverin der Wirkungsquotient der beiden Stoffe ermittelt. Zur Auswertung kamen 9 derartige Injektionsserien, in deren Verlauf etwa konstante Kreislaufverhältnisse herrschten. Der Wirkungsquotient Khellin/Papaverin betrug im Mittel der 9 Beobachtungspaare 0,48. Der entsprechende Wert für das Verhältnis der blutdrucksenkenden Wirkung war 0,56. Soweit die Dauer der Durchflußsteigerung

sicher zu erfassen war, zeigte sich, daß Khellin kürzer wirkte als Papaverin, ihm jedoch an Wirkdauer weniger nachstand als an Wirkstärke.

Auf Grund dieser Versuche wird Khellin hinsichtlich seiner gefäßerweiternden Wirkung charakterisiert als qualitativ gleichartig dem Papaverin bei etwa halber maximaler Wirkungsstärke desselben. Hinweis auf das Verhältnis der spasmolytischen Wirkung am Darm und der Toxicität der beiden Stoffe von 1:2[1].

H. Lüllmann (Mainz): Über die Brauchbarkeit des Herz-Lungenpräparates der Ratte zur Prüfung der Herzwirksamkeit von Substanzen

Die von Begovic u. Stern angegebene Methodik wird erweitert und folgende Größen registriert: Aortendruck mit Statham-Element, venöser Einflußdruck mit einer empfindlichen Mareyschen Kapsel auf optischem Wege und das Minutenvolumen durch elektrischen Tropfenzähler. Diese Größen werden gleichzeitig auf einem Photokymographion aufgenommen. Bei einem Teil der Präparate wurde zusätzlich das Elektrokardiogramm abgeleitet. Folgende Kreislaufwerte ergeben sich aus über 50 gelungenen Herzlungenpräparaten (jeweils am Beginn des Versuches vor Zusatz einer Substanz): Systolischer Druck 135,0 mm Hg ± 3,4 (mittlerer Fehler des Mittelwertes), diastolischer Druck 94,1 mm Hg ± 4,1, Herzschläge/min 209,0 ± 5,8 und Herzminutenvolumen 52,0 Tr./min ± 2,6.

Die Empfindlichkeit des Präparates gegenüber Adrenalin ist groß, schon 0,00005 mg herznah injiziert führen zu einem beträchtlichen Anstieg des systolischen Druckes, einer Vergrößerung der Amplitude, Zunahme des Minutenvolumens und einem leichten Absinken des venösen Einflußdruckes. Acetylcholin, um 0,001 mg herznah injiziert, führt zum gegenteiligen Effekt, Absinken des arteriellen Druckes und Anstieg des venösen Einflußdruckes. Beide Effekte sind sehr kurzfristig. Nach Schädigung des Herzens durch Barbiturate läßt sich ein positiv inotroper und negativ chronotroper Effekt des Strophanthin auslösen. Die Purinkörper Theophyllin und Coffein (Dosierung 0,05—0,5 mg) setzen den arteriellen Druck herab und erhöhen den venösen Einflußdruck, schädigen also das Herz. Nur vereinzelt kommen Steigerungen des arteriellen Druckes nach Purinkörpern vor, die aber immer positiv chronotrop wirken. Nach gleichzeitiger Anwendung von Adrenalin und Purinkörpern kommt es zum Auftreten eines Pulsus alternans, der auch im Elektrokardiogramm demonstriert werden kann.

Die Untersuchung der pharmakologischen Standardsubstanzen am Herzlungenpräparat der Ratte zeigen die Brauchbarkeit dieser Versuchsanordnung zur Prüfung der Wirksamkeit von Substanzen.

[1] Uhlenbrook, K., u. Mitarb.: Arzneimittel-Forsch. **3**, 219 (1953).

Diskussion. Schmid (Heidelberg): v. Bubnoff hat in Heidelberg vergleichende Untersuchungen an Ratten- und Meerschweinchen-HLP mit Strophanthin durchgeführt. Die mittlere therapeutische Dosis lag bei der Ratte bei 0,08 mg/g Herzgewicht und beim Meerschweinchen bei 0,009 mg/g. Eine durch Somnifen bewirkte Insuffizienz des Herzens läßt sich an der Ratte durch Strophanthin nicht beheben, wohl aber am Meerschweinchen.

Taeschler (Basel): Die am Ratten-HLP gewonnenen Ergebnisse können bestätigt werden. Es hat den Nachteil, daß die Ratte gegen herzwirksame Glykoside eine große Resistenz besitzt. Mit einem technisch analogen Vorgehen kann man auch am Meerschweinchen HLP herstellen. Dieses bietet den Vorteil, daß das Meerschweinchen 10mal empfindlicher für Herzglykoside ist. Das Minutenvolumen betrug 15—30 cm^3/min, das totale Blutvolumen etwa 20 cm^3. Man benötigt für das HLP des Meerschweinchens ein Spendertier.

H. L. Merck (Würzburg): Über Glykosidbestand und Resorption von „Gitalin"

Eine eingehend untersuchte Charge von „Gitalin"-KRAFT (Verodigen) enthält nach Haack u. Mitarb.[1] rund 45% herzwirksame Glykoside, davon als Gitoxigeninderivate Gitoxin, Gitaloxin (ein Formylgitoxin), Strospesid und ein als U_4 bezeichnetes Glykosid; als Digitoxigeninderivat ist neben Digitoxin u. a. Odorosid H vorhanden. Der bei Katzen nach intraduodenaler Verabreichung einer Verodigenaufschwemmung eintretende Effekt beträgt ein Vielfaches der möglichen Digitoxinwirkung. Von den Reinglykosiden wirkt Digitoxin vom Duodenum aus in Form einer Suspension schwächer als in alkoholischer Lösung, Gitoxin und Gitaloxin sind an der Katze für sich allein enteral praktisch unwirksam, Strospesid hat eine gewisse Wirkung. Verodigen übertrifft aber vom Duodenum aus Gemische entsprechender Mengen der Reinglykoside bei weitem. Die Ursache hierfür liegt in bisher zu wenig beachteten resorptionsfördernden Bestandteilen der Digitalisblätter, mit deren Unterstützung auch die vorhandenen Glykoside der Gitoxigeninreihe vom Duodenum aus voll zur Resorption kommen. Reines Gitoxin oder Gitaloxin wird durch Zusatz derartiger Stoffe gut resorbierbar.

E. Habermann und W. P. Neumann (Würzburg): Crotactin, ein neues pharmakologisches Wirkprinzip aus dem Gift von Crotalus terrificus

In den letzten Jahren haben uns verschiedene elektrophoretische Verfahren bei der Auftrennung tierischer Gifte in ihre Komponenten gute Dienste geleistet. Jedoch gelangten wir im Laufe der Zeit an die Grenze der Leistungsfähigkeit derartiger Methoden, welche durch die Bildung von Assoziationskomplexen zwischen Substanzen verschiedenen

[1] Haack, E., F. Kaiser u. H. Spingler: Naturwissenschaften 42, 441, 442 (1955).

isoelektrischen Punktes sowie durch die Adsorption ans Trägermedium gesteckt ist. Es erschien deshalb als großer Fortschritt, als W. P. Neumann an unserem Institut die Ionenaustauschchromatographie zur Fraktionierung tierischer Gifte anwandte. Zunächst interessierte uns das Gift der brasilianischen Klapperschlange, insbesondere das von Slotta hieraus dargestellte Crotoxin. Dem Chemiker erschien diese Substanz besonders wichtig, weil sie als erster Eiweißkörper aus tierischen Giften kristallisiert erhalten wurde, dem Pharmakologen, weil sie dennoch zwei grundverschiedene Effekte ausübt: sie ist allgemeintoxisch und spaltet Phospholipoide. Da wir in früher von uns angestellten Versuchen mit Phospholipase A anderer Herkunft praktisch keine Toxicität gefunden hatten, war zu vermuten, daß Crotoxin, trotz seiner scheinbaren chemischen Einheitlichkeit, weiter auftrennbar sein müsse.

Im einzelnen wurde so vorgegangen, daß einige Milligramm Gift bzw. Crotoxin bei p_H-Bereichen um den Neutralpunkt an einer mit dem Ionenaustauscher IRC 50 beschickten Säule mit Puffer chromatographiert wurden. Die Eluate wurden mittels eines Fraktionsschneiders getrennt aufgefangen. Besondere Mikromethoden wurden entwickelt, um in kleinsten Flüssigkeitsmengen gleichzeitig Aminogruppen, Allgemeintoxicität, Phospholipase A, Hyaluronidase, das thrombinartige Prinzip, verschiedene Phosphatasen sowie die Ophio-Aminosäureoxydase zu bestimmen.

Es gelang W. P. Neumann, innerhalb eines sehr engen p_H-Bereiches eine Abtrennung des phospholipoidspaltenden vom allgemeintoxischen Prinzip zu erzielen. Benutzt man Crotalus-terrificus-Gesamtgift als Ausgangsmaterial, so haftet an der „Toxin"-Fraktion noch ein geringer Coagulase-Rest. Verwendet man stattdessen die coagulasefreie, durch Erhitzen und Fällung dargestellte Crotoxin-Fraktion des Giftes, so ist hieraus ein Produkt erhältlich, welches keinen der bisher bekannten fermentativen Effekte von Crotalusgift mehr ausübt, wohl aber ein deutliches pharmakologisches Wirkungsspektrum besitzt.

Crotactin — so nannten wir diese Substanz — dürfte wohl das Haupttoxin des Klapperschlangengiftes darstellen. Seine *Allgemeintoxicität* (LD 50) liegt nach intraperitonealer Injektion bei der weißen Maus um 0,06—0,07 mg/kg, während die von Crotoxin bei 0,1 mg/kg, die von Terrificusgesamtgift bei 0,15 mg/kg liegt. Aus der Mutterlauge der Crotoxinfällung kann man ein zweites, im Gegensatz zum Crotactin basisches Prinzip darstellen, welches bei der Injektion der mehrfachen tödlichen Dosis Krämpfe erzeugt, während Crotactin in allen Konzentrationsbereichen nur lähmte. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Nebentoxin um Crotamin, das bereits von anderen Autoren beschrieben wurde. Über den eigentlichen Mechanismus der Vergiftung durch die beiden Toxine läßt sich noch nichts Eindeutiges aussagen: bis jetzt konnten makroskopisch und histologisch keine mit Sicherheit als primäre Giftwirkung zu deutende Veränderungen gesehen werden. Ein primärer Herztod oder ein peripher bedingter Atemtod ist abzulehnen.

An detaillierten pharmakologischen Effekten fiel besonders die *Erhöhung der Capillarpermeabilität* auf. Injiziert man einem Kaninchen Evans-Blau intravenös und anschließend Crotactin in die zuvor enthaarte Rückenhaut, so läßt sich noch bei Toxinmengen von 0,5—2,0 γ eine Blaufärbung der Quaddel erkennen. Es ist dies nicht auf eventuellen Hyaluronidasegehalt zurückzuführen; denn ein spreading findet nicht statt. Auch lokale Reizung, Entzündung oder Nekrose konnte mit Mengen bis zu 100 γ nach subconjunktivaler oder intracutaner Injektion nicht gesehen werden.

Eine *Erregung der glatten Muskulatur* ist nicht nur durch Crotalus-Gesamtgift, sondern auch durch Crotactin möglich. Die Kontraktion nach Crotactin erfolgt langsam und hat eine hochgradige Tachyphylaxie zur Folge, die sich gegen Crotactin selbst sowie gegen Gesamtgift richtet, während die Histamin- oder Acetylcholineffekte wenig abgeschwächt werden. Atropin vermindert die Crotactinwirkung, hebt sie aber nicht auf.

Die *Blutdrucksenkung* durch Crotalusgesamtgift kann im Gegensatz zu den bisher genannten Effekten nicht allein oder überwiegend dem darin enthaltenen Crotactin zugeschrieben werden. Die Relation zwischen Drucksenkung durch Gesamtgift und durch Crotactin schwankt von Tier zu Tier stark, zwischen 1:3 und 1:20. Möglicherweise erklärt sich dies dadurch, daß bei der Wirkung höherer Gesamtgift-Dosen auch ein von Tier zu Tier verschieden stark ausgeprägter reflexartiger Mechanismus beteiligt ist; denn es tritt gelegentlich nicht nur Drucksenkung, sondern auch Bradycardie und temporärer Atemstillstand ein. Durch Crotoxin oder Crotactin konnte dieser Reflex bisher nicht ausgelöst werden.

Zusammenfassend können wir feststellen, daß mit dem Crotactin erstmalig aus Schlangengift ein nach den heutigen Kenntnissen fermentfreies Toxin dargestellt wurde. Es liegt bezüglich seiner Allgemeingiftigkeit an der Spitze aller bisher hieraus isolierten Komponenten. Auch an seinem Beispiel erwies sich, daß Fermentaktivität und Allgemeintoxicität tierischer Gifte nicht parallel laufen, ferner, daß Kristallisierbarkeit kein Beweis für die Einheitlichkeit einer eiweißartigen Substanz ist.

H. W. Raudonat (Frankfurt a. M.): Papierchromatographische Auftrennung von Schlangengiften

Mit Hilfe geeigneter Lösungsmittel war es möglich, eine schonende — mit keinem nennenswerten Aktivitätsverlust verbundene — Auftrennung von Schlangengiften (Vip. ammodytes, Naia nivea) vorzunehmen. Den so gewonnenen Fraktionen ließen sich spezifische Fermentwirkungen zuordnen (Protease, Ribonucleotidase, Lecithinase A). Es konnte ferner ein Hemmstoff für Protease nachgewiesen werden. Vergleichsversuche mit Frisch- und Trockengift ergaben charakteristische Unterschiede.

F. Markwardt (Greifswald): Untersuchungen über Hirudin

Mit 1 Textabbildung

Im Jahre 1884 fand Haycraft im Schmiedebergschen Institut, daß der Blutegel eine blutgerinnungshemmende Substanz besitzt. In der folgenden Zeit konnte dieser Wirkstoff, von Jacoby als Hirudin bezeichnet, mehr oder weniger angereichert, bisher aber nicht als Reinsubstanz isoliert werden.

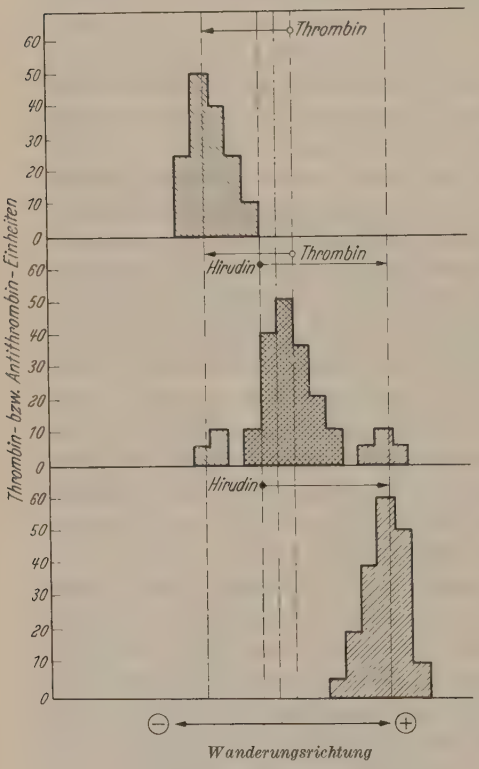


Abb. 1. Wanderung von Thrombin, Hirudin bzw. von einem Thrombin-Hirudin-Komplex auf dem Elektrophoresestreifen

Wir haben den Wirkstoff rein dargestellt, indem wir für die entscheidenden Reinigungsschritte die Verteilungschromatographie an der Papierpulversäule und die präparative Elektrophorese anwandten. Wir gewannen eine chromatographisch und elektrophoretisch einheitliche Substanz. Es handelt sich um ein hochmolekulares Polypeptid, dessen Molekulargewicht wir nach Versuchen mit der Ultrazentrifuge und fraktionierter Ultrafiltration auf etwa 20000 schätzen. Der isoelektrische Punkt liegt bei p_H 4,0. Nach Hydrolyse und Vortrennung in Gruppen durch Hochspannungsionophorese wurde die Aminosäurenzusammensetzung papierchromatographisch ein- und zweidimensional bestimmt.

Die gerinnungshemmende Wirkung des Hirudins beruht auf seiner Fähigkeit, eine Verbindung mit dem Gerinnungsferment Thrombin zu bilden, wodurch dessen katalytische Wirkung zum Erlöschen gebracht wird. Da diese Reaktion stöchiometrischen Gesetzen folgt, kann die Wirksamkeit des Hirudins in „Antithrombin-Einheiten" (AT.-E.) angegeben werden, wobei eine AT.-E. derjenigen Menge Hirudin entspricht, die eine NIH-Einheit Thrombin in seiner Wirkung auf das Fibrinogen unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen zu blockieren vermag. Eine AT.-E. entspricht 0,12 γ reinen Hirudins.

Mit der reinen Substanz und mit gereinigtem Thrombin (Topostasin-ROCHE) versuchten wir, die spezifische Antithrombinwirkung des Hirudins anschaulich zu machen. Wir benutzten hierzu die allgemein übliche Papierelektrophorese in der „feuchten Kammer", welche zur Trennung von Eiweißstoffen dient, in diesem Falle zur Erkennung der Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin. Dies war möglich, da Hirudin und Thrombin bei einem p_H-Wert zwischen 4,0 und 4,7 unterschiedliche Wanderungsrichtung im elektrischen Feld besitzen.

Wir trugen eine Hirudinlösung und eine Thrombinlösung 1 cm voneinander entfernt strichförmig auf dem Elektrophoresepapier auf und ließen sie bei p_H 4,3 gegeneinander laufen. Auf je einem Parallelstreifen läuft eine Thrombinlösung und eine Hirudinlösung allein zur Kontrolle. Nach der Elektrophorese werden die Elektrophoresestreifen in $1\frac{1}{2}$ cm breite Querstreifen senkrecht zur Laufrichtung unterteilt. Die Querstreifen werden mit isotonischem Phosphatpuffer p_H 7,0 eluiert und auf ihren Gehalt an Thrombin, Hirudin und Thrombin-Hirudin-Verbindung getestet. Der Gehalt an Hirudin wurde durch Titration des Eluates mit einer standardisierten Thrombin-Lösung bestimmt. Der Thrombingehalt wurde gemessen, indem umgekehrt eine bekannte Menge Hirudin mit der unbekannten Thrombinlösung titriert wurde. Der Thrombin-Hirudin-Komplex wurde ermittelt, indem das Eluat 15 min auf 80° erhitzt wurde, wodurch das Thrombin denaturiert und das bei dieser Temperatur noch beständige Hirudin aus dem Komplex quantitativ in Freiheit gesetzt wird, was an der erneut auftretenden Wirkung gegen frisches Thrombin erkannt werden kann. Das Ergebnis der Austestungen zeigt die Abb. 1.

Besteht zwischen beiden Körpern eine Affinitätsbeziehung, so muß ein mehr oder weniger großer Anteil der sich gegenseitig überwandernden Komponenten bei dem innigen Kontakt während der Überwanderung gebunden werden. Bestünde zwischen beiden Substanzen keine Reagibilität, so wären sie durcheinander hindurchgewandert. Wie die Versuche zeigten, verbinden sich die beiden Reaktionspartner zu einem inaktiven Komplex. Dieser Komplex besitzt einen isoelektrischen Punkt bei p_H 4,3 und wandert bei Verwendung von Pufferlösungen mit anderem p_H-Wert geschlossen im elektrischen Feld.

Bei dem strichförmigen Auftragen der Lösungen auf dem Elektrophoresestreifen läßt sich keine absolut gleichmäßige Konzentration der Wirkstoffe pro Zentimeter Strichlänge erreichen, so daß nicht immer die gleiche Anzahl von Hirudinmolekülen auf die gleiche Anzahl von Thrombinmolekülen trifft. Infolgedessen wird ein geringer Teil nicht gebunden und wandert weiter.

A. Herz (München): Über die Wirkung von Flavonabkömmlingen auf die Membran von Pferdeerythrocyten

Die osmotische Resistenz von Pferdeerythrocyten wird durch verschiedene Substanzen mit Flavongerüst in entgegengesetzter Richtung beeinflußt: Körper wie Hesperitin z. B. bewirken eine *Erhöhung* der osmotischen Resistenz; dieser liegt Kaliumverlust der Zellen zugrunde. Substanzen wie Rutin, Quercetin rufen dagegen eine sehr schnell

einsetzende, jedoch bald zum Stillstand gelangende *Verminderung* der osmotischen Resistenz hervor. Am Beispiel des Rutins wird dieses Verhalten näher beschrieben: Unter dessen Einwirkung erfahren die Resistenzkurven eine Parallelverschiebung nach der Seite der höheren Kochsalzkonzentrationen. Trotz weiterer Anwesenheit wirksamer Substanz schreitet die Resistenzverminderung aber nicht bis zur Hämolyse fort. Inkubation in hypertonen Lösungen hat stärkere, Inkubation in hypotonen Lösungen dagegen schwächere Herabsetzung der osmotischen Resistenz zur Folge. Hämatokritbestimmungen zeigen Volumvergrößerung der Erythrocyten; doch besteht keine Korrelation zwischen Erythrocytenschwellung und Resistenzverminderung. Auch Flavone, die keine Verminderung der osmotischen Resistenz hervorrufen, bewirken eine Vergrößerung des Hämatokritwertes. In KCl-Milieu verläuft die Resistenzverminderung in ähnlicher Weise wie in Kochsalzlösung. Aus diesen Befunden wird geschlossen, daß die Resistenzverminderung nicht durch Kationenbewegungen (im Sinne kolloid-osmotischer Hämolyse), sondern durch direkte Beeinflussung des kritischen Hämolysevolumens bewirkt wird.

C. Schneider (Marburg): Kreisprozeß der Hämiglobinbildung durch aromatische Nitroverbindungen mit isolierten Fermenten

Die Bildung mehrerer Äquivalente Hämiglobin je Mol Gift durch aromatische Nitroverbindungen beruht nach Untersuchungen von Kiese auf einem durch Mitwirkung von Fermenten im Erythrocyten unterhaltenen Kreisprozeß. Nach Reduktion der Nitroverbindung zum Phenylhydroxylamin bildet dieses durch Umsetzung mit Hämoglobin und Sauerstoff Hämiglobin und Nitrosobenzol. Das Nitrosobenzol wird enzymisch wieder zu Phenylhydroxylamin reduziert.

Auf indirektem Wege, nämlich durch Bestimmung der Stoffwechselprodukte, wurde ermittelt, daß die Reduktion des Nitrosobenzol durch ein Ferment erfolgt, das Kiese 1943 bei der Untersuchung der Reduktion des Hämiglobin im Erythrocyten entdeckt und Hämiglobinreduktase benannt hat. Zur endgültigen Bestätigung der Rolle der Hämiglobinreduktase bei der Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol haben wir zusammen mit Kiese u. Waller die Hämiglobinreduktase aus Erythrocyten isoliert und ihre Wirkung zusammen mit Resag näher untersucht.

Die Hämiglobinreduktase ist ein Ferment, das Wasserstoff von hydriertem Triphosphopyridinnucleotid auf geeignete Acceptoren überträgt. Es reagiert nicht nur mit Nitrosobenzol, sondern auch mit Methylenblau. Auf dieser Reaktion beruht die katalytische Wirkung des Methylenblaus bei der *Reduktion* des Hämiglobins.

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung des Fermentes verwandten wir Menschenerythrocyten. Als Test bei den Reinigungsoperationen für das Ferment

wurde die Reduktion von Methylenblau benutzt. In einem Standardsystem von Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (Zwischenferment), TPN und Methylenblau, das ohne Reduktase keinen Sauerstoff aufnimmt, diente die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme als Maß für die Fermentaktivität. Das Zwischenferment wurde aus Hefeplasmolysat dargestellt durch ein Verfahren, das die Abtrennung aller gelber Fermente ermöglichte.

Durch Entfernung des Hämoglobins aus dem Hämolysat von Menschenzellen mit Alkohol und Chloroform und Fraktionierung mit Ammoniumsulfat gelang eine Anreicherung der Hämiglobinreduktase auf das 900fache der Aktivität im Erythrocyten. Die Fermentlösungen sind bei 0° C 2—3 Wochen ohne wesentlichen Wirkungsverlust beständig.

Die isolierte Hämiglobinreduktase reduziert Hämiglobin nur sehr langsam. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen am intakten Erythrocyten reduziert das Ferment sowohl Nitrosobenzol als auch Methylenblau sehr schnell.

Mit der Reduktase und dem System Glucose-6-Phosphat, Zwischenferment und TPN als Wasserstoffdonator konnte der Kreisprozeß der Hämiglobinbildung durch Nitrosobenzol durchgeführt werden.

Wie im Erythrocyten wurden von jeder Molekel Nitrosobenzol viele Äquivalente Hämiglobin gebildet. Die Ausbeute an Hämiglobin je Mol Nitrosobenzol war wie im Erythrocyten um so größer je niedriger die Nitrosobenzolkonzentration war. In dem Versuch mit 5×10^{-7} Mol Nitrosobenzol je Liter wurden in 30 min 1000 Äquivalente Hämiglobin je Mol Nitrosobenzol gebildet.

Die Wirksamkeit der Hämiglobinreduktase bei der Wasserstoffübertragung von hydriertem TPN auf Nitrosobenzol oder Methylenblau ist wesentlich größer als die des von Warburg u. Christian entdeckten alten gelben Ferments aus Hefe, das wir zum Vergleich ebenfalls untersucht haben. Andererseits wird Hämiglobin durch altes gelbes Ferment schneller reduziert als durch Hämiglobinreduktase.

Durch die Isolierung der Hämiglobinreduktase und die Untersuchung ihrer Reaktion mit Nitrosobenzol und Methylenblau ist endgültig gesichert, daß die Wirkungen dieser beiden Gifte im Erythrocyten, nämlich die Beschleunigung der Hämiglobin*bildung* durch Nitrosobenzol und die Beschleunigung der Hämiglobin*reduktion* durch Methylenblau, auf der Reaktion mit der Hämiglobinreduktase beruhen.

Diskussion. Repke (Berlin-Buch): Aus einer Reihe von Arbeiten geht hervor, daß hochgereinigte Reduktasen eine ausgeprägte Acceptorspezifität besitzen. Die Spezifität kommt offenbar den untersuchten Präparaten der Hämiglobin-Reduktase nicht zu. Es ergibt sich daraus die Frage, ob die benutzten Präparate einheitlich sind bzw. wie weit die Hämiglobin-Reduktase in ihren Eigenschaften mit dem alten gelben Ferment, der Diaphorase, der Cytochrom-Reduktase oder anderen Reduktasen identisch ist.

Schlußwort. Schneider: Die Hämiglobin-Reduktase ist weder mit dem alten gelben Ferment noch mit Cytochrom C-Reduktase identisch. Sie reagiert weder mit Sauerstoff noch mit Cytochrom C.

K. Flemming (Greifswald): Versuche über Strahlenhämolyse

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war eine von dem amerikanischen Physiologen W. O. Fenn im Jahre 1916 gemachte Beobachtung, die besagt, daß Gelatine durch Alkohol in reinen Lösungen von NaCl und von $CaCl_2$ schwerer fällbar ist als in Mischlösungen dieser Salze (Abb. 1). Bei reihenmäßiger Anordnung der Versuchsansätze in der Weise, daß sich die reinen Salzlösungen außen befinden und zwischen ihnen die Mischlösungen, in denen der Na-Gehalt ständig ab- und der Ca-Gehalt ständig zunimmt, zeigte die Alkoholfällbarkeit einen bogenförmigen Verlauf mit Anstieg und Abfall. Diese Versuche W. O. Fenns sind mit grundlegend gewesen für die Lehre vom Ionenantagonismus.

Diese Gesetzmäßigkeit konnte in späteren Untersuchungen von G. Teichler u. K. Erdmann auch dann bestätigt werden, wenn an Stelle der Gelatine Serum-Albumin oder -Globulin und als Fällungsmittel an Stelle des Alkohols ultraviolettes Licht oder Röntgenstrahlen verwendet wurden (Abb. 2 und 3).

Die Abhängigkeit der Strahlenwirkung vom Ionenmilieu läßt sich aber nicht nur am Eiweiß, sondern anscheinend auch an einigen Grundfunktionen der lebenden Zelle nachweisen. Zunächst zeigte die Wachstumshemmung durch Röntgenstrahlen eine gleiche oder ähnliche Milieuabhängigkeit in der Fennschen Salzgemischreihe. Das konnte bereits an Hefezellen und neuerdings auch an Colibacillen und Bacterium Proteus von Erdmann und seinen Mitarbeitern festgestellt werden (Abb. 4). Wir schließen aus diesem zum Eiweiß parallelen Verhalten des Wachstums, daß die Wachstumshemmung durch Strahlen ursächlich mit der Entquellung des Eiweißes in der Zelle zusammenhängt.

Ich wandte mich nun der Frage zu, ob die Röntgenstrahlenwirkung auf die Permeabilitätsvorgänge einem ähnlichen Einfluß des Ionenmilieus unterliegt. Zu diesem Zweck benutzte ich Schweineerythrocyten, die ich in isotonischer Glucoselösung auf der Zentrifuge wusch. Die isotonische Glucoselösung mischte ich im Verhältnis 4:1 mit isotonischen Lösungen der Fennschen Reihe und bestrahlte den ganzen Ansatz mit Röntgenstrahlen bei 200 kV Spannung und 20 Milliamp. Röhrenstrom, meistens 40 min lang.

Bei dieser Versuchsanordnung zeigte sich eine Verschiedenheit der Hämolysestärke, die sich gut in die bisher am Eiweiß und am Wachstum erhaltenen Resultate einordnen läßt. Auch die Hämolyse ist in reiner NaCl-Lösung und in reiner $CaCl_2$-Lösung am kleinsten und zeigt in den Mischlösungen einen stufenweisen Anstieg und Abfall (Abb. 5, 6 u. 7).

Gelegentlich fand sich das Hämolysemaximum auch in der reinen Calciumchloridlösung. Hier scheint ein Zeitfaktor eine Rolle zu spielen;

denn wir beobachteten, daß ein ursprünglich bogenförmiger Hämolyseverlauf innerhalb der Reihe sich bei längerem Stehenlassen der Ansätze wieder verwischen kann.

Prinzipiell läßt sich demnach die Strahlenhämolyse in die Gesetze einordnen, die für das Verhalten des Eiweißes zum Wasser seit langem bekannt sind. Daraus kann geschlossen werden, daß die Ursache dieser Hämolyse in Entquellungsvorgängen zu suchen ist, die sich bei der Bestrahlung an den Eiweißkörpern der Erythrocytenmembran vollziehen.

B. Wiegershausen (Berlin): Neue Befunde bei der Hämolyse mit Hexadecylsulfonat

Mit 2 Textabbildungen

Beim Studium der Hämolyse mit Hexadecylsulfonat (HDS) zeigte es sich, daß ein befriedigendes Verständnis der experimentellen Befunde nur bei Berücksichtigung der Assoziationsneigung des Hämolyticums möglich ist.

Für den Ablauf der HDS-Hämolyse[1] konnte gezeigt werden, daß die kompliziert erscheinende Kinetik bei Anwendung der McBainschen[3] Vorstellungen über Dissoziationsgleichgewichte wäßriger Seifenlösungen analysierbar wird.

Wir setzen die Anschauungen als bekannt voraus. Danach können wir den Ablauf der Hämolyse durch 3 verschiedene Phasen charakterisieren:

1. Phase: Adsorption des Hämolyticums.
2. Phase: Umordnung des Lyticums an der Zellmembran.
3. Phase: Die eigentliche Hämolyse der Zellen.

Der Vorteil dieser Theorie zeigt sich darin, daß sie die Möglichkeit bietet, das Auftreten von Hemmzonen, von denen hier die Rede sein soll, zu erklären.

Wir machten diese Beobachtungen beim Studium der Beziehungen zwischen Hämolysegrad und Hämolyticum-Konzentration. Auf die einfache Methodik, die wir schon früher angewandt haben, ist in früheren Arbeiten eingegangen worden.

Bei der Hämolyse mit HDS ist bei 10^{-6}—10^{-7} g HDS/ml und einer Zellkonzentration von 5—1,25 · 10^{8} Zellen/ml die Hämolyse nahe 0%. Sowohl in Richtung der höheren Konzentration, wie auch in Richtung der niederen Konzentration kommt es zur Zunahme der hämolytischen Aktivität. Letztere erreicht nicht so starke Grade.

Wir finden dieses Phänomen bei frischer, alter und alter vorbehandelter (d. h. kurz aufgekochter) HDS-Lösung, jedoch immer nur bei 40° C. Hier zeigen Konzentrationen von 10^{-8}—10^{-9} g HDS/ml (1 : 100 Mill.)

noch hämolytische Aktivität (Abb. 1). Auch bei 22° C kann man dieses Phänomen beobachten, wenn man als zusätzlichen Parameter steigende Salzkonzentrationen bei Abnahme der HDS-Konzentration nimmt, d.h. von Aqu. dest. (0%) bis zur physiologischen Kochsalzlösung (0,9%).

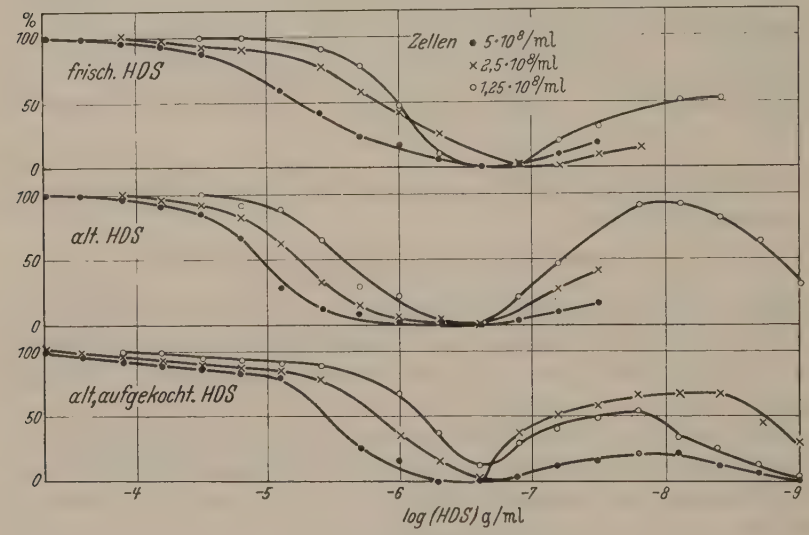


Abb. 1 vgl. Text

Hier tritt mit abnehmender Salzkonzentration trotz zunehmender HDS-Konzentration (Abb. 2) im Bereich von 10^{-4}—10^{-5} g HDS/ml eine Hemmzone (ausgezogene Kurve) auf, die bei 10^{-4} g HDS/ml nur noch 50% Hämolyse macht. Diese HDS-Konzentration führt in Elektrolytmilieu zu stärkster Hämolyse (gestrichelte Kurve).

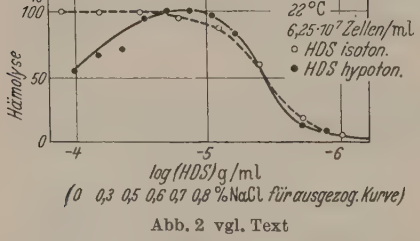


Abb. 2 vgl. Text

Weitere Erhöhung der HDS-Konzentration macht wegen zu starker Trübung die colorimetrische Messung unmöglich. Die Variation der Versuchsbedingungen ist demnach entscheidend für den Ablauf der HDS-Hämolyse.

Es sind jedoch nicht nur Alter, Konzentration, Temperatur und Vorgeschichte des Hämolyticums für seinen Polymerisationsgrad bestimmend, sondern auch das Lösungsmittel, wie es in der letzten Versuchsanordnung zum Ausdruck kommt. In hypotonischem Milieu treten die Hemmzonen bei höheren HDS-Konzentrationen auf, als im Elektrolytmilieu.

Diese Tatsache ist von besonderer Bedeutung, da hier eine Adsorption von HDS-Komplexen vorliegen muß, die sogar eine osmotische Hämolyse durch Aqu. dest. verhindern. Damit spielen, ähnlich wie beim Digitonin[2], bei der Hämolyse mit HDS osmotische Faktoren keine Rolle. Die Adsorption von HDS-Komplexen an die Erythrocytenoberfläche kann je nach den Versuchsbedingungen zur Hämolyse führen oder sie verhindern.

Literatur

[1] Jung, F., J. Wendler u. B. Wiegershausen: (unveröffentlicht). [2] Jung, F., u. I. Schwarzkopff: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 563 (1952). — [3] McBain: zit. nach Lottermoser: Kolloid. Z. **63**, 49, 175 (1944).

K. Repke (Berlin): Lichtwirkungen auf wasserstoffübertragende Fermente der Haut

Ultraviolette Strahlen und bei Gegenwart von Photosensibilisatoren auch sichtbares Licht hemmen die Aktivität wasserstoffübertragender Fermente in der intakten Haut wie in fermenthaltigen Extrakten der Cutis. Wesentliche Ursache der Inaktivierung ist unter geeigneten Versuchsbedingungen die Photooxydation des Fermentsulfhydryls. Die Beobachtungen können gegebenenfalls zum Verständnis der Lichtdermatosen beitragen.

R. Koch (Freiburg/Brsg.) und U. Hagen (Heiligenberg/Baden): Zur Toxikologie der Monojodessigsäure und ihrer abgestuften Affinität zu Sulfhydrylkörpern

Mit 8 Textabbildungen

In Schutzversuchen an röntgentotalbestrahlten Mäusen konnten wir (Langendorff, Koch u. Hagen) nachweisen, daß den Sulfhydrylkörpern der Cystein-Cysteaminreihe eine spezifische Wirkung zukommt, die an das gleichzeitige Vorhandensein einer freien SH- und einer Aminogruppe gebunden ist. Ausgehend von der Arbeitshypothese, daß bei der Bestrahlung im Organismus durch freigesetzte Radikale SH-Gruppen oxydiert und mithin inaktiviert werden, untersuchten wir (Langendorff u. Koch) den Einfluß SH-blockierender Körper auf den Ablauf des Strahlenschadens. In Übereinstimmung mit Feinstein, Cotter u. Hampton konnten wir feststellen, daß nur der Monojodessigsäure ein strahlensensibilisierender Effekt zukommt. Die DL 50 bei Totalbestrahlung fällt von 323,5 $\pm$ 14,8 r auf 267,4 $\pm$ 21,8 r, wenn die Mäuse vor der Bestrahlung 700 γ Monojodessigsäure erhalten. Dieser Befund und die Beobachtung von Franks, Shaw u. Dickson, die eine Hemmung

des Tumorwachstums nach Monojodessigsäure wie nach einer Röntgenbestrahlung feststellten, gaben Veranlassung, sich mit der Toxikologie der Halogenessigsäure näher zu beschäftigen.

Im Gegensatz zu den zahlreichen Beobachtungen über den Einfluß der Monojodessigsäure auf Atmung und Gärung sind die toxikologischen Befunde dürftig. Schon bei kurzfristiger Vergiftung stellen sich bei Ratte und Maus charakteristische Organveränderungen ein, die im allgemeinen bei beiden Species gleichsinnig eintreten, im Verhalten der Niere jedoch Unterschiede aufweisen. Im Kurzversuch von wenigen Tagen verändert sich die Rattenniere nicht. Die Mäuseniere zeigt dagegen das Bild einer schweren Nephrose (s. Abb. 1). Der allergrößte Teil des Tubulusapparates ist nekrotisch, lediglich ein Teil der Hauptstücke ist noch intakt. Dagegen sind die Sammelröhrchen nicht angegriffen, nur ihr Lumen zeigt Eiweißausgüsse (Abb. 2). Die Glomerulusschlingen sind geschwollen, es findet sich eine Kernvermehrung und eine hochgradige Schwellung der Endothelien der Bowmanschen Kapsel, wie man sie selten so ausgeprägt sieht.

Besonders auffallend ist bei beiden Tierarten das Verhalten von Darm, Milz und Thymus. — Der Darm bietet das Bild eines schweren paralytischen Ileus, angefüllt mit dünnflüssigem Inhalt. Spontanperistaltik ist nur noch wenig vorhanden; auch auf Reiz treten nur geringe Darmbewegungen ein. Funktionell ist der Ileus nicht komplett, da die Tiere dünnflüssigen Kot entleeren. Die histologische Untersuchung bietet keine schweren Veränderungen. — Die Milz ist schon nach 3 bis 4 Tagen verkleinert (Ratte: $2 \times 1{,}5$ mg Monojodacetat oder $3 \times 1{,}0$ mg/180—220 g Tier i.p.; Maus: $2 \times 0{,}5$ mg Monojodacetat/20 g Tier i.p.). Die histologischen Veränderungen sind bei der Maus charakteristischer als bei der Ratte. Es kommt zu einer Rückbildung der Malpighischen Körperchen mit Kernpyknose. Die rote Pulpa ist aufgelockert und zellarm. Bei der Maus sind die Blutbildungsherde stark verringert und verkleinert mit nur noch vereinzelten Megacaryocyten (s. Abb. 3, normale Mäusemilz; Abb. 4, Milz eines 2 Tage vergifteten Tieres). — Die schwerste Veränderung finden sich in der Thymus. Bei beiden Tierarten kommt es innerhalb von 48 Std zu einer hochgradigen Atrophie (s. Abb. 5 u. 6). Man erkennt die Rückbildung des lymphatischen Gewebes und die massive Einwanderung junger Bindegewebszellen im Gegensatz zum Kontrolltier. — Auch das Knochenmark zeigt zum Teil starke Veränderungen (Abb. 7, Mark einer gesunden Ratte; Abb. 8, Mark einer vergifteten Ratte nach 72 Std). Bei dem vergifteten Tier finden sich neben einer Kernpyknose flächenhafte Blutungsherde mit schollig abgelagertem Fibrin.

Eine ganze Reihe der vorgetragenen Befunde erinnern an Vorgänge, wie wir sie nach einer Bestrahlung mit energiereichen Strahlen

beobachten können. Es ist daher möglich, die Monojodessigsäure mit Einschränkung in die Gruppe der Radiomimetica einzureihen.

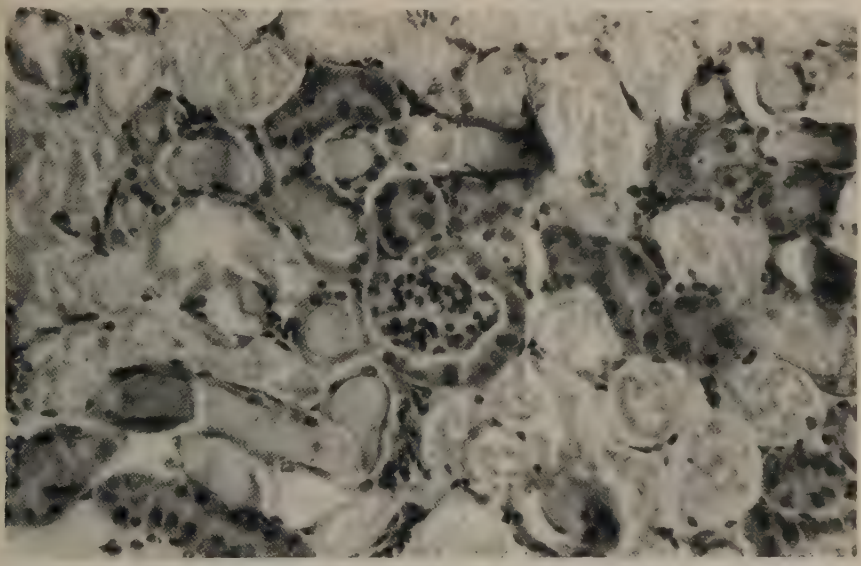


Abb. 1. Maus, Niere, 2 × 0,5 mg Monojodessigsäure (neutralisiert mit NaOH) in 48 Std. i.p., nach 72 Std. abgetötet. H.E., Paraffin ,5μ, Obj. 16, Okul. 8/1,6, 300×

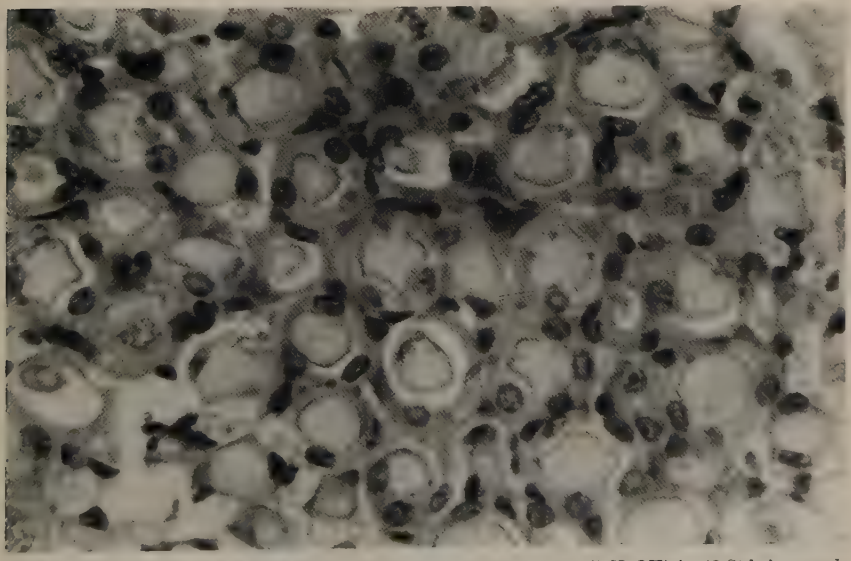


Abb. 2. Maus, Niere, 2 × 0,5 mg Monojodessigsäure (neutralisiert mit NaOH) in 48 Std. i.p., nach 72 Std abgetötet. H.E., Paraffin, 5μ, Obj. 40, Okul. 8/1,6, 745×

Eine interessante chemische Eigenschaft besitzt die Monojodessigsäure, die sie in Beziehung setzt zu den Schutzkörpern der Cysteïn-Cysteaminreihe. Sie alkyliert SH-Gruppen in folgender Reaktion: $R—SH + JCH_2COONa \rightarrow R—S—CH_2COONa + HJ$. Dabei konnten

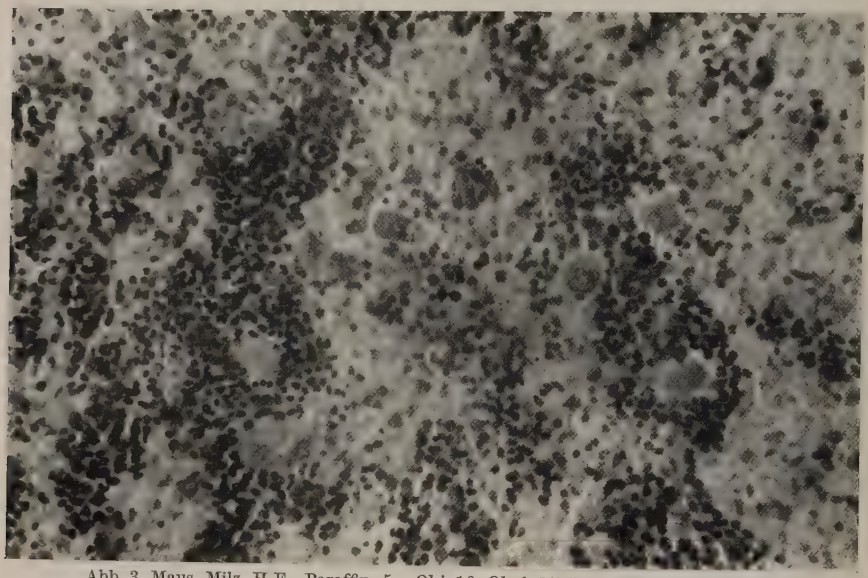


Abb. 3. Maus, Milz, H.E., Paraffin, 5μ, Obj. 16, Okul. 8/1,6, 300×, normales Tier

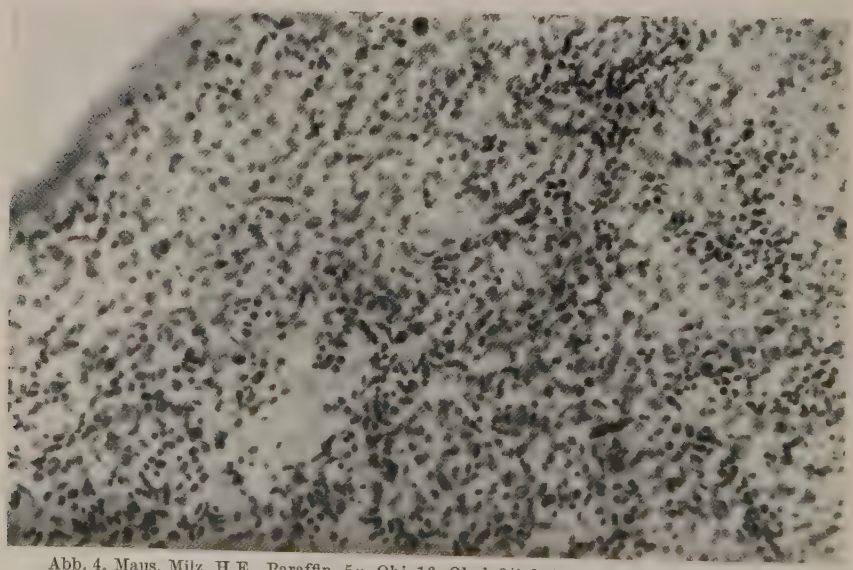


Abb. 4. Maus, Milz, H.E., Paraffin, 5μ, Obj. 16, Okul. 8/1,6, 300×, Monojodessigsäure-Tier

Michaelis u. Schubert als erste feststellen, daß sich die einzelnen SH-Körper verschieden schnell umsetzen. Wir prüften ebenfalls eine Reihe verschiedener SH-Verbindungen und beobachteten, daß sich unsere Schutzkörper, wie Tab. 1 ausweist, sehr schnell alkylieren, während andere

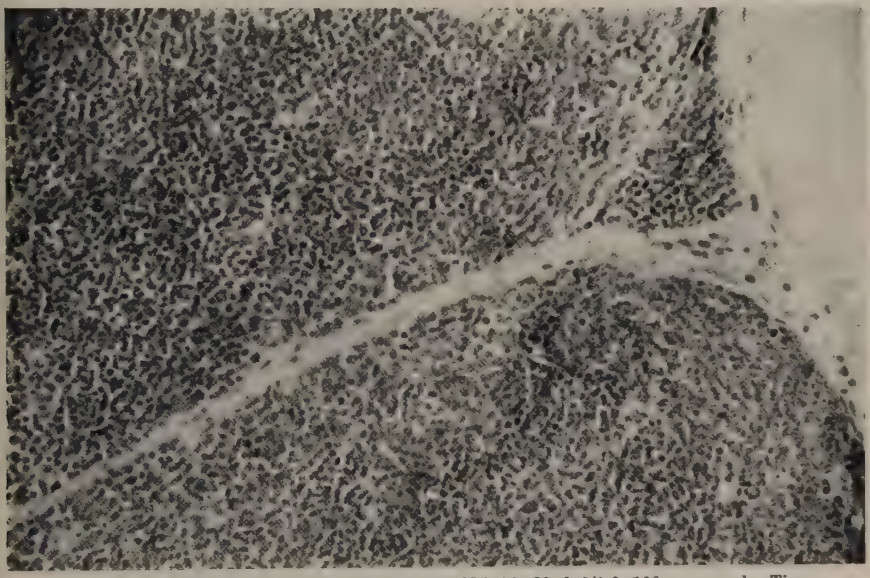


Abb. 5. Ratte, Thymus, H.E., Paraffin, 5μ, Obj. 16, Okul. 8/1,0, 190×, normales Tier

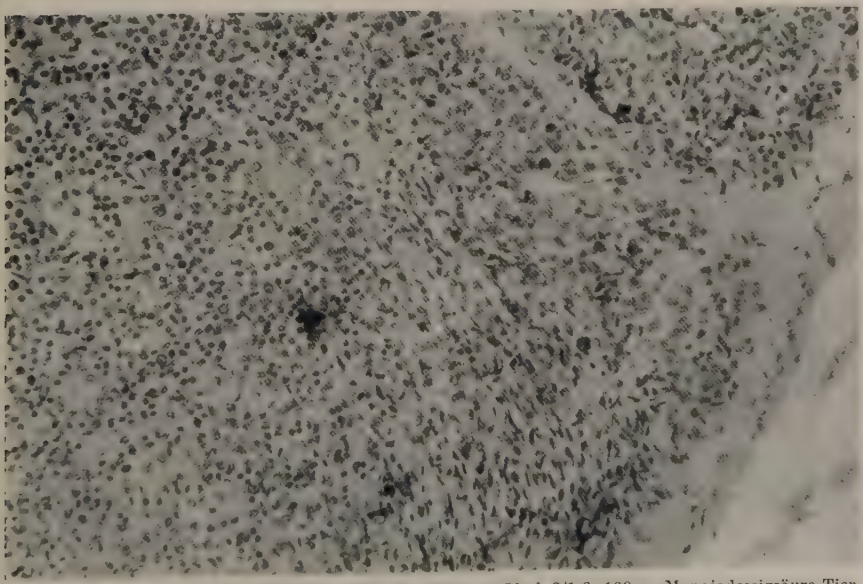


Abb. 6. Ratte, Thymus, H.E., Paraffin, 5μ, Obj. 16, Okul. 8/1,0, 190×, Monojodessigsäure-Tier

nicht schützende Sulfhydrylkörper das viel langsamer tun. Dabei scheint für die Umsetzungsgeschwindigkeit das Vorhandensein einer Aminogruppe am Molekül der SH-Verbindung von Bedeutung zu sein. Durch Alkylierung des Aminostickstoffes kommt es zu einer Beschleunigung der

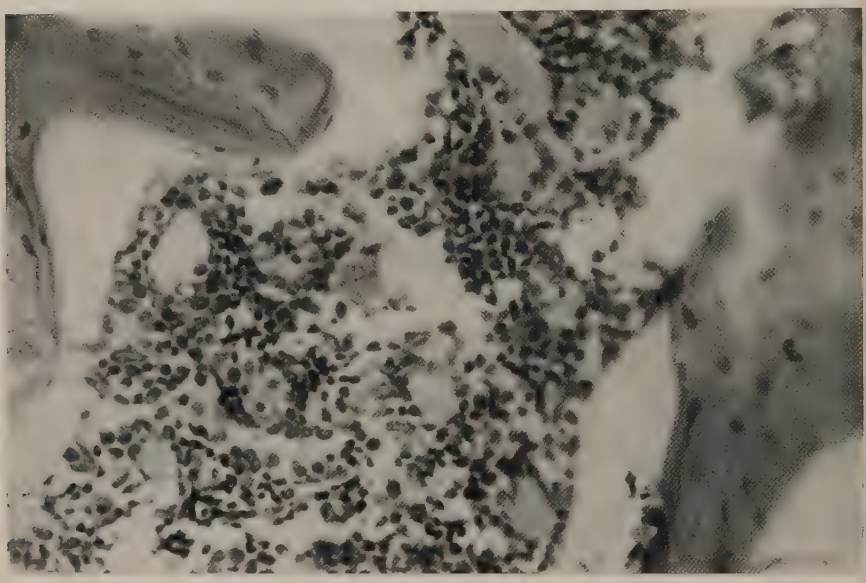


Abb. 7. Ratte, Knochenmark, H.E., Paraffin, 5μ, Obj. 16, Okul. 8/1,6, 300×, normales Tier

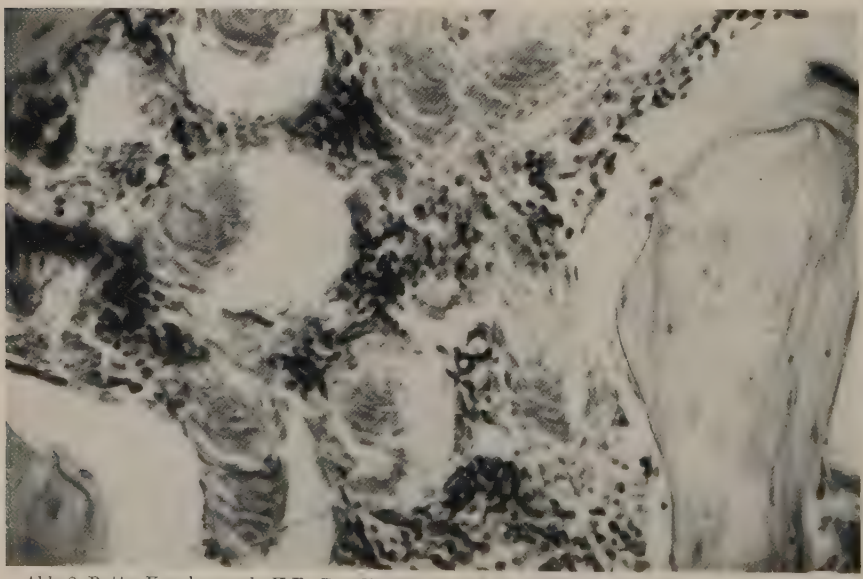


Abb. 8. Ratte, Knochenmark, H.E., Paraffin, 5μ, Obj. 16, Okul. 8/1,6, 300×, Monojodessigsäure-Tier

Reaktion, was mit der Strahlenschutzwirksamkeit und der Zunahme ihrer Toxicität konform geht. Eine Säureamid-Bindung oder eine solche an Phenol schwächt dagegen das Reaktionsvermögen wieder ab.

Tabelle 1. *Zeit der 50%igen Umsetzung verschiedener Sulfhydrylverbindungen mit äquimolaren Mengen Monojodessigsäure: p_H 7,0, T 37° C*

in 0—15 min	in 30—300 min
Glutathion	Thioglykol
Cystein	Thioglykolsäure
Homocystein	BAL
Cysteamin	N-Phenylcysteamin
N-Dimethylcysteamin	
: Schutzsubstanzen	: keine Schutzsubstanzen

Die Monojodessigsäure besitzt mit den angeführten radiobiologischen, toxikologischen und chemischen Eigenschaften eine interessante Schlüsselstellung bei weiteren Arbeiten zur Aufklärung des Strahlenschutzmechanismus der Cystein-Cysteamingruppe.

Literatur

FEINSTEIN, R. N., G. J. COTTER and M. M. HAMPTON: Amer. J. Physiol. **177**, 156 (1954). — FRANKS, W. R., M. M. SHAW and W. H. DICKSON: Amer. J. Cancer. **22**, 601 (1934). — LANGENDORFF, H., R. KOCH u. U. HAGEN: Strahlenther. **95**, 238 (1954). — LANGENDORFF, H., u. R. KOCH: Strahlenther. **95**, 535 (1954). — MICHAELIS, L., and M. P. SCHUBERT: J. of Biol. Chem. **106**, 331 (1934).

M. KRAMER (Freie Universität, Berlin): Untersuchungen über die Pathogenese anaphylactoider Ödeme der Ratte

Von Dextran, Eiereiweiß und Compound 48/80 ist bekannt, daß sie Histamin in Geweben oder im Blut freisetzen können (PATON, FELDBERG und Mitarbeiter, HAHN und Mitarbeiter, HALPERN u. BRIOT, SCHACHTER u. TALESNIK). Ebenso rufen alle drei Substanzen an Ratten Ödeme der Pfoten und Schnauzen hervor. Einen naheliegenden ursächlichen Zusammenhang zwischen beiden Wirkungen nimmt u. a. FELDBERG an, der einige Befunde zur Unterstützung dieser Theorie erheben konnte (FELDBERG u. MILES, FELDBERG u. TALESNIK). Gegen diese Annahme spricht beim Dextranödem die verschiedene Beeinflußbarkeit durch Antihistaminica (MORRISON u. a.). Zur Klärung dieser Frage wurde die Histaminverarmung der Rattenpfotenhaut nach verschieden langer chronischer Behandlung durch intraperitoneale Injektionen von Dextran, Eiereiweiß und Compound 48/80, sowie gleichzeitig die Prozentzahl der mit Ödemen reagierenden Tiere registriert. Die Histaminbestimmung

wurde nach Feldberg u. Talesnik vorgenommen, die Auswertung erfolgte am isolierten Meerschweinchendarm oder am Blutdruck der Katze. Die Ödemintensität, die bei intraperitonealer Injektion ohnehin nur geschätzt werden kann, wurde nicht berücksichtigt.

Die drei Ödemarten unterscheiden sich hinsichtlich der Zeit ihres Auftretens und ihrer Dauer. Nach Compound 48/80 tritt die Ödemreaktion etwa 15 min nach der Injektion auf und ist nach 30—60 min abgeklungen. Das Eiklar- und das Dentranödem entwickeln sich nach 1—1½ Std, das Eiklarödem klingt nach etwa 5 Std ab, das Dextranödem nach 6—7 Std. Während die letztgenannten Ödeme bei der ersten Injektion am häufigsten (fast bei 100% der Tiere) auftreten, entwickelt sich das Ödem nach Compound 48/80 erst nach der 3., 4. oder 5. Injektion, wenn die Haut bereits weitgehend an Histamin verarmt ist. Die Tiere zeigen nach den ersten Injektionen eine starke Acrocyanose, während später Pfoten und Schnauze hellrot gefärbt sind, wenn Ödeme auftreten. Die Dosis betrug am 1. Tage 1 mg, am 2. und 3. Tage 2 mg und an den folgenden Tagen 4 mg/kg. Die Ödemhäufigkeit schwankte zwischen 50 und 80%. Eine Resistenz ließ sich nicht erzielen. Der Histamingehalt, der normalerweise 86,8 γ/g Haut beträgt, hatte am 4. Tage um 97% abgenommen. Später waren immer nur wenige γ/g nachzuweisen.

Bei den Versuchen mit Eiklar wurden die Tiere täglich mit 0,5 ml/100 g intraperitoneal behandelt. Die Ödemhäufigkeit nahm in den ersten Tagen rasch ab und wies dann große Schwankungen auf. Am 16. Tage hatte sich eine Resistenz entwickelt, die bis auf eine Ausnahme in den folgenden 8 Tagen bestehen blieb. Der Histamingehalt der Haut hatte nach 10 Tagen seinen niedrigsten Wert von 47 γ/g (gegenüber 86,8 γ/g normal) erreicht und blieb dann gleich, ohne weiter ab- oder zuzunehmen.

Die tägliche Dextrandosis betrug 300 mg/kg intraperitoneal. Die Ödemhäufigkeit nahm im Verlauf der Behandlung bis auf 50—60% ab. Der Histamingehalt der Haut nahm stärker ab als beim Eiklar bis auf 17 γ/g (16. Tag). Eine Resistenz aller Tiere gegen Dextran ließ sich nur mit höheren Dosen und nur für 1—2 Tage hervorrufen.

In einem weiteren Versuch wurden 20 Ratten in 6 Tagen mit insgesamt 12 mg/kg Compound 48/80 vorbehandelt. Danach wurde von 5 Tieren der Histamingehalt der Pfotenhaut bestimmt. Er betrug im Mittel 7,6 γ/g. Das sind 9% des normalen Histamingehaltes. 8 Tieren wurden 300 mg/kg Dextran und den restlichen 7 Tieren 0,5 ml/100 g Eiklar gespritzt. Sämtliche Tiere bekamen starke Ödeme der Pfoten und Schnauzen.

Aus den mitgeteilten Befunden ergibt sich, daß die Histaminfreisetzung für die Ödementstehung bei allen drei Substanzen wahrscheinlich keine ursächliche Bedeutung hat.

Literatur

Feldberg, W.: J. of Pharmacy a. Pharmacol. **6**, 281 (1954). — Feldberg, W., and A. A. Miles: J. of Physiol. **120**, 205 (1953). — Feldberg, W., and J. Talesnik: J. of Physiol. **120**, 550 (1953). — Hahn, F.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, No. 1 (1954). — Hahn, F., A. Lange u. H. Giertz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 603 (1954). — Hahn, F., u. A. Wellmann: Klin. Wschr. **1952**, 998. — Halpern, B. N., G. Biozzi, M. Briot et B. Benacerraf: C. r. Soc. Biol. (Paris) **147**, 1180 (1953). — Halpern, B. N., et M. Briot: C. r. Soc. Biol. (Paris) **146**, 1552 (1952). — Halpern, B. N., M. Briot et Th. Neveu: C. r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 308 (1954). — Morrison, J. L., A. P. Richardson et W. L. Bloom: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 98 (1951). — Paton, W. D.: Brit. J. Pharmacol. **6**, 499 (1951).

H. Veigel (Mannheim): **Zur pharmakologischen Beeinflussung verschiedener Entzündungsformen**

Durch intrapalpebrale Injektion von entzündungserregenden Stoffen, z. B. Pyrifer und Bienengift in geeigneter Verdünnung, lassen sich am Kaninchenaugenlid umschriebene Entzündungen erzeugen, deren Stärke durch Messung der Liddicke quantitativ erfaßt werden kann. Obwohl aus der Schwellung des Augenlids nichts Näheres über die anatomische Form der Entzündung ausgesagt werden kann, so ist der „Tumor" doch ein Leitsymptom, dessen pharmakologische Beeinflussung auch in anderen Versuchsanordnungen vielfach zur Beurteilung antiphlogistischer Wirkungen benutzt wird.

Zwischen der durch *Pyrifer* und *Bienengift* hervorgerufenen Schwellung des Augenlids besteht zunächst ein Unterschied im *zeitlichen Verlauf*. Während die Pyriferentzündung schon 3 Std nach der Injektion ihr Maximum erreicht und innerhalb der nächsten 12 Std wieder völlig abklingt, entwickelt sich die Bienengiftentzündung protrahierter. Das Maximum der Schwellung liegt zwischen 12 und 20 Std nach der Injektion. Wenn man mit geeigneter experimenteller Anordnung (Gruppen zu 10 Kaninchen, Kreuzversuch am gleichen Tier mit und ohne Antiphlogisticum) 50 mg/kg Aminophenazon 1½ Std vor und kurze Zeit (3 Std) nach Pyrifer i.m. verabfolgt, so ist das Maximum der Lidschwellung gegenüber dem Kontrollversuch um etwa 50% herabgesetzt und wird auch im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr erreicht. Zum selben Zeitpunkt ist die Lidschwellung nach Bienengift durch die gleiche Aminophenazondosis ebenfalls abgeschwächt, geht aber nicht wie beim Pyrifer zurück, sondern steigt weiter an und erreicht schließlich ein Maximum, das etwa 30% *über* dem Kontrollwert ohne Aminophenazon liegt. Dieser Verlauf ist selbst durch fortgesetzte Aminophenazonbehandlung nicht zu beeinflussen. Während also die *Pyriferschwellung* gehemmt wird, läßt sich die *Bienengiftschwellung* bei zeitlich entsprechendem Vorgehen *durch*

Aminophenazon verstärken. Kleinere Aminophenazondosen, welche die Pyriferschwellung nicht hemmen, verstärken nicht die Wirkung des Bienengiftes.

Der Hemmungseffekt des Aminophenazons wird durch den Antihistaminkörper *Luvistin* gesteigert, so daß die Kombination von zwei unwirksamen Dosen zusammen nahezu ebenso wirksam ist, wie die doppelte Menge des in der Kombination enthaltenen Aminophenazons. Überraschenderweise verhält sich selbst diese Kombination an der Bienengiftentzündung wie Aminophenazon, d. h. es kommt wiederum zu einer weitaus stärkeren Lidschwellung als mit Bienengift allein.

Prinzipiell analog verhält sich *Cortison* bei parenteraler Applikation: nach 10 mg/kg i.m. ist die Pyriferschwellung etwa um 60% gehemmt und die Lidverdickung nach Bienengift zunächst vermindert. Später aber steigt sie wie nach Aminophenazon über den Kontrollwert hinaus an. Auch *Natriumgentisat* in der hohen Dosis von 2,5 g/kg verhält sich qualitativ wie Aminophenazon. Mit *Salicylamid-Na-Glykolat* ließ sich nur die Pyriferschwellung vermindern, die Bienengiftreaktion blieb unbeeinflußt.

Bei weiteren Versuchen zur Analyse dieser Befunde zeigte sich, daß der Zeitpunkt, an dem das Antiphlogisticum zur Wirkung kommt, von Bedeutung ist. Wird an Stelle der prophylaktischen Applikation von Aminophenazon (1½ Std vor Pyrifer bzw. Bienengift) nur 3 Std nach Entzündungsbeginn auf dem Höhepunkt der Schwellung injiziert, dann hat Aminophenazon keinen Einfluß auf den weiteren Verlauf. Hauptversuch und Kontrollversuch stimmen damit praktisch überein.

Zu diesem Zeitpunkt muß also der durch das Pharmakon beeinflußbare Prozeß der Pyriferentzündung abgelaufen sein und sich eine weitere nicht mehr hemmbare Phase angeschlossen haben. Andererseits muß die Verstärkung der Bienengiftwirkung mit einer in ihrem Frühstadium stattgefundenen pharmakologischen Alteration zusammenhängen, sonst ließe sich nicht erklären, warum der Verstärkungseffekt nur auftritt, wenn das Aminophenazon schon zu Beginn der Bienengiftentzündung im Organismus vorhanden ist.

Die Beobachtung, daß auch die Bienengiftentzündung im Anfangsstadium durch Aminophenazon vermindert wird, könnte eventuell als Hinweis angesehen werden, daß die Hemmung der initialen Ödemphase der Entzündung sich bei bestimmten Entzündungsformen nachteilig auf den weiteren Entzündungsverlauf (eventuell auf die cellulären Prozesse) auswirken kann. Somit sind die allgemein als „Antiphlogistica" bezeichneten Pharmaka nicht immer im positiven Sinne zu bewerten. Eine Beurteilung entzündungshemmender Stoffe ist deshalb mit der alleinigen Erfassung der initialen Ödemphase nicht möglich.

W. Schoetensack (Konstanz): Der Einfluß einiger Analgeticis auf die Ödemausbildung an der Rattenpfote im Vergleich zur ihrer Konzentration im Blut

Vergleichende quantitative Untersuchungen über den Einfluß chemischer Verbindungen auf das Rattenpfotenödem sind infolge der fraglichen Spezifität des Testes nur begrenzt möglich. Der Test ist jedoch geeignet, die Wirkungsdauer verschiedener Substanzen festzulegen. Hierzu wird eine für Reihenuntersuchungen geeignete Methode beschrieben; sie ermöglicht es, den Einfluß unterschiedlicher Dosierungen zu verschiedenen Zeitpunkten zu ermitteln. Parallel zu diesen Untersuchungen wird die Konzentration einiger Pharmaka im Blut von Ratten bestimmt. Der protektive Einfluß dieser Verbindungen auf die Ödemausbildung wird mit der jeweiligen Konzentration im Blut verglichen. Dabei werden Veränderungen, welche unter der Einwirkung gleichzeitig applizierter Retard-Substanzen beobachtet wurden, an Hand einiger Beispiele beschrieben. Scheinbare Diskrepanzen zwischen Blutkonzentration einerseits und Ausmaß der Schutzwirkung beim Rattenpfotenödem andererseits werden erörtert. Bemerkungen zur quantitativen Bestimmung verschiedener Analgeticis in kleinsten Blutmengen.

H. Röttger (Rheuma-Forschungsanstalt, Bad Elster): Die Beeinflußbarkeit der unter einer Balneotherapie ablaufenden humoralen Regelvorgänge bei Rheumatikern

(Untersuchungen über den Einfluß von Pyrazolonen und Trimethyl-(3-dimethylcarbamidsäurephenylester-)ammonium-methylsulfat)

Mit 4 Textabbildungen

Unter der Moorbadebehandlung kommt es immer wieder bei Rheumatikern zu frischen exsudativen Schüben. Diese zwingen zu einer Aufgabe der Badetherapie. Meist wird versucht, die negative Entwicklungstendenz des Krankheitsbildes mit Pyrazolonen aufzuhalten. Es erhob sich grundsätzlich die Frage, inwieweit durch diese Stoffgruppen bekannte humorale Regelabläufe beeinflußt werden und ob aus der Kenntnis dieser Pyrazolonwirkung sich Rückschlüsse auf eine Vermeidbarkeit exsudativer Schübe ergaben. Es ließ sich beweisen, daß unter Pyrazolonen der Regelablauf sich verändert. Dieser Vorgang wurde von uns durch die Wirkung auch auf negative Reaktionsmechanismen erklärt. Aus diesem Grunde wandten wir in einer zweiten Untersuchungsreihe Neoeserin (Trimethyl-(3-dimethylcarbamidsäurephenylester-)ammonium-methylsulfat) an, ein Präparat, das reine cholinergische Wirkung besitzt. Nach den bisherigen Untersuchungen ist die Wirkung des Neoeserins der der Pyrazolone nicht vergleichbar.

Geprüft wurden das Präparat „15109", eine Kombination verschiedener Pyrazolon-Derivate (Farbwerke Hoechst), und „Neoeserin" (Firma Isis, Zwickau i. Sa.). Jedes Präparat wurde an einer Gruppe von chronischen Rheumatikern (Abb. 1) untersucht (jeweils 19 Patienten). Die Beobachtungszeit erstreckte sich bei jedem Patienten auf 6 Wochen. Eine Kontrollgruppe (Abb. 2) wurde jeweils nur balneologisch und mit physiologischer Kochsalzlösung als Injektion behandelt. Badezeit, -dauer, -temperatur usw., Injektionszeit wurden weitgehend konstant gehalten.

Die Blutproben wurden am 3., bzw. am 5. Kurtag, die folgenden in gleichmäßigen Zeitabständen von 4 Tagen, die letzte bis zum 41. Kurtag entnommen. Untersucht wurde das gesamte Blutbild, die Reticulocyten, Blutplättchen, Gesamteiweiß, sämtliche Fraktionen des Blutplasmas, Kalium, Calcium und Natrium. Jede Einzelbestimmung resultiert aus Mehrfachbestimmungen. Gesamteiweiß wurde refraktometrisch, Fibrinogen gravimetrisch, die übrigen Eiweißfraktionen papierelektrophoretisch und die Mineralien flammenphotometrisch bestimmt. Aus der Vielzahl der Ergebnisse möchten wir für die Pyrazolonreihe einige charakteristische Daten mitteilen.

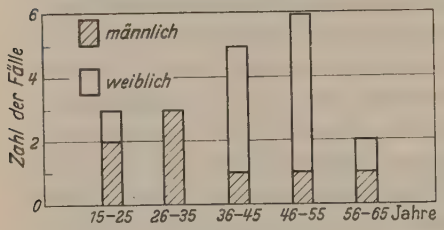


Abb. 1. Alter und Geschlechtsverteilung. Versuchsreihe

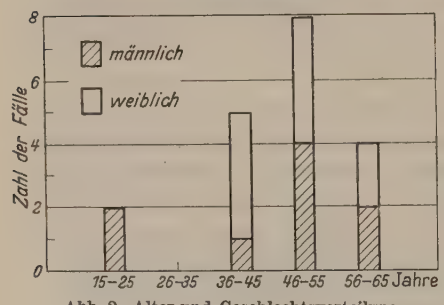


Abb. 2. Alter und Geschlechtsverteilung. Kontrollreihe

Da das Versuchsmaterial aus einer verhältnismäßig langen Beobachtungszeit gewonnen wurde, mußte es hinsichtlich der Streuung auf seine Homogenität geprüft werden. Wir benutzten dazu den BARTLETT-Test. Das errechnete Chi-Quadrat darf zu den einzelnen Terminen keine signifikanten Werte ergeben, wenn die einzelnen Messungen im Hinblick auf die Streuung als Teile einer Grundgesamtheit angesehen werden sollen.

Für die Leukocyten und für das Gesamteiweiß ergaben sich folgende Werte: Leukocyten Chi-Quadrat 16,72, Gesamteiweiß Chi-Quadrat 27,7.

Die beiden Untersuchungsreihen mit den 22 Terminen können also als homogen betrachtet werden und die Anwendung varianzstatistischer Überprüfungsmethoden ist zulässig. Für die Signifikation der einzelnen Abläufe wird jeweils ein F-Wert angegeben, dessen erforderliche Höhe sich nach der Zahl der vorhandenen Freiheitsgrade richtet. Signifikante Differenzen wurden weiterhin mit einem t-Wert gesichert. An der Seite der Abbildung ist die den Kollektiven anhaftende Variationsbreite eingezeichnet.

1. Leukocyten (Abb. 3). Beide Gruppen — sowohl die Pyrazolon- als auch die Kontrollreihe — lassen keine gemeinsamen Züge erkennen. Die Unterschiede werden durch den F-Wert von 2,43 gekennzeichnet. (Erforderlich bei 369 und 10 Freiheitsgraden, 1,9 für 5% und 2,4 für 1%

Überschreitungswahrscheinlichkeit.) Die stärkere Variation erleidet die Pyrazolonreihe vom 3. bis zum 9. Kurtag, es erfolgt ein signifikanter Abfall, dem sich jedoch wieder bis zum 25. Kurtag ein Anstieg anschließt. Am Ende der Untersuchungsperiode sinken die Leukocytenwerte auf ihren tiefsten Punkt am 37. Kurtag. Bei der Kontrollreihe steigen vom Kurbeginn die Zahlen bis zum 13. Kurtag an ($t = 2{,}41$, $p = 2{,}6$). Die Änderungen nach diesem Zeitpunkt lassen zwar zunächst einen leichten

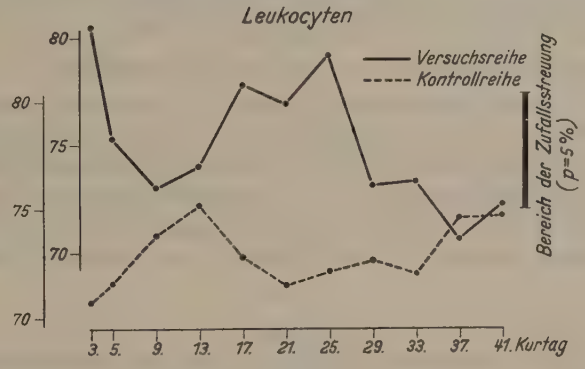


Abb. 3

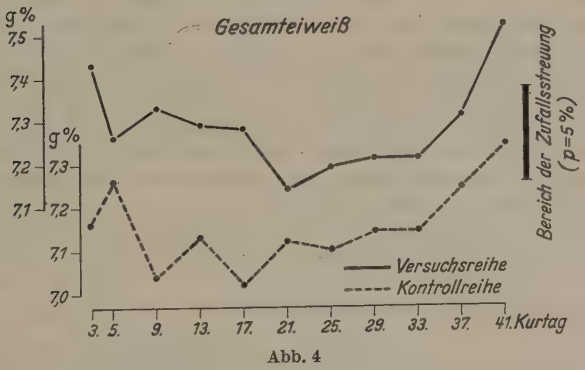


Abb. 4

Abfall erkennen, die Werte liegen aber noch in der normalen Streuungsbreite des Kollektivs.

2. Gesamteiweiß (Abb. 4). Beide Reihen verlaufen während der Untersuchungsperiode annähernd im gleichen Sinn. Die gemeinsamen Züge finden in dem F-Wert von 2,46 ihren Ausdruck, der gleichzeitig eine statistisch gesicherte Varianz während der Kur andeutet. Auf Grund dieses Verlaufs lassen sich zwei Perioden ableiten. In der ersten sinken die Gesamteiweißwerte ab. Nach einem Umkehrpunkt, der in der Versuchsreihe deutlich am 21. Kurtag ausgeprägt ist, steigen sie langsam, am Ende stärker an.

Die Versuchsreihe mit Neoeserin ließ gegenüber der Kontrollreihe keine signifikanten Unterschiede bei den bisher vorliegenden Ergebnissen erkennen.

Herrn Dr. Wagner bin ich für die Unterstützung in der statistischen Auswertung zu Dank verpflichtet.

E. G. Stenger und H. Naumann (Homburg/Saar): Beitrag zum antiphlogistischen Wirkungsmechanismus des Chinins

Chininsulfat (50 mg/kg s. c.) zeigt am Formalinödem der normalen Ratte eine Entzündungshemmung von 64% (Domenjoz[1], Theobald[3]). Nach Hypophysektomie (Domenjoz u. a.[2]) ist noch eine deutliche, wenn auch abgeschwächte Hemmung (47%), nach Adrenalektomie (Theobald u. a.[4]) keine Beeinflussung des Rattenpfotenödems festzustellen. In Ergänzung dieser Befunde untersuchten wir nach halb- und doppelseitiger Thyreo-Parathyreoidektomie den Einfluß des Chininsulfates auf das Formalinödem der Ratte.

Methodik

Die halb- bzw. doppelseitige Ablation von Schild- und Nebenschilddrüse wurde in Äthernarkose an männlichen, weißen Ratten durchgeführt. Alle operierten Tiere erhielten während einer Woche täglich 100 mg/kg Calcium (Sandoz) subcutan und außerdem als Trinkwasser 1%ige Calciumlactatlösung (DAB-Ware), wodurch parathyreoprive Krampfzustände vermieden wurden. Acht Tage nach der Operation erfolgte der Entzündungsversuch. Die letzte Calciuminjektion wurde 24 Std vor Versuchsbeginn verabreicht. Die Messung des Rattenpfotenödems führten wir nach der in unserem Institut üblichen Methode durch. Als Phlogisticum wurde 0,1 cm³ einer 3%igen Formalinlösung subcutan an der Plantarseite einer Hinterpfote der narkotisierten Tiere (Narkose: 100 mg/kg Numal-Roche s.c.) injiziert. 15 min nach der Formalinapplikation begann die Schwellungsmessung und erstreckte sich über eine Zeitspanne von 2 Std. Chininsulfat (DAB-Ware) wurde in der Dosierung von 50 mg/kg eine halbe Stunde vor der Formalininjektion subcutan verabreicht.

Tabelle 1

	Tiergewicht in g	Tierzahl	Schwellung nach 120 min in mm³	ε in ± %	Hemmung in %
Hemi-Ablation					
Kontrollen	142	37	250	4,97	—
Chininsulfat	140	47	182	4,70	27
Total-Ablation					
Kontrollen	131	44	176	4,89	—
Chininsulfat	134	31	171	5,75	3

Hemi-Ablation. Bei unilateral operierten, mit 7 × 100 mg/kg Calcium behandelten Tieren änderte sich der Schwellwert nach Injektion von 50 mg/kg Chininsulfat um —27% (signifikante Differenz D = 4.51) im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Total-Ablation. Bilateral operierte, mit 7 × 100 mg/kg Calcium behandelte Tiere zeigten nach der Injektion von 50 mg/kg Chininsulfat keine Änderung des Schwellwertes (Änderung: —3%; signifikante Differenz D = 0,38) im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Die an der intakten Ratte ausgeprägte Hemmung des Formalinödems durch Chininsulfat ist somit nach doppelseitiger Ablation von Thyreoidea und Parathyreoidea vollständig aufgehoben. Nach unilateraler Exstirpation beider Organe verbleibt noch eine geringe antiphlogistische Wirkung. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die Rattenschilddrüse am Entzündungsgeschehen mitbeteiligt sein muß.

Literatur

[1] Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 14 (1955). — [2] Domenjoz, R., W. Theobald, E. G. Stenger et K. Mörsdorf: Arch. internat. Pharmacodynamie **103**, 341 (1955). — [3] Theobald, W.: Arch. internat. Pharmacodynamie **103**, 17 (1955). — [4] Theobald, W., et R. Domenjoz: Arch. internat. Pharmacodynamie (im Druck).

H. Matthies (Berlin): Über Struktur- und Stoffwechselwirkungen von Formaldehyd

Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Adstringentien wurde an Kaninchenerythrocyten als Zellmodell die Wirkung von Formaldehyd untersucht, Formaldehyd steigert bei einem Konzentrationsoptimum von $5 \cdot 10^{-3}$ m die Methämoglobin-Rückbildungsgeschwindigkeit um über 200%. Die Beschleunigung ist durch NaF, Na-Jodacetat und Na-Formiat nicht hemmbar. Die Brenztraubensäurebildung methämoglobin haltiger Zellen wird durch Formaldehyd gleichzeitig gehemmt. Diese Formaldehydwirkung ist auch durch andere aliphatische und durch aromatische Aldehyde zu erzielen. Am pathologischen Fermentsystem der Erythrocyten eines Falles von idiopathischer Methämoglobinämie war durch Formaldehyd ebenso wie durch Lactat keine Rückbildungsbeschleunigung zu erreichen. Bei dem Vergleich der morphologischen Befunde mit diesen Beobachtungen ergab sich, daß der starke Abfall der Stoffwechselaktivierung im Bereich höherer Formaldehydkonzentrationen mit den ersten morphologisch faßbaren Veränderungen an der Zellstruktur einhergeht.

W. Schmid (Tübingen): Über die Bedeutung von intermediären Carbonsäuren für die Zellvermehrung der Hefe

Nach früher mitgeteilten Versuchen vermehrt sich Bäckerhefe in zucker- und biosfaktorenhaltiger Nährlösung unter nur aeroben Bedingungen. In neuen Versuchen wurde nunmehr eine „reine Atmung" durch

Angebot von Carbonsäuren (Acetat, Pyruvat, Citrat, Succinat) und von Glutaminsäure erzeugt, deren Veratmungsgeschwindigkeiten bis zu 80% der Glucoseatmung betragen können. Unter diesen Bedingungen unterbleibt die Zellvermehrung völlig. Nach dem mikroskopischen Zellbild und nach den Hämatokritwerten nimmt aber die Einzelzelle an Volumen zu; sie wächst also. Gärung durch Zuckerzusatz bringt die Vermehrung sofort in Gang. Die Glykolyse ist demnach, wie Warburg seit langem postuliert, eine für die Zellvermehrung notwendige Voraussetzung.

Es wurde nun durch Monojodacetat (m/500) Glykolyse und Vermehrung blockiert. (Bei geringeren Konzentrationen ist zwar die Glykolyse unterbrochen, die Vermehrung aber nicht sicher stillgestellt.) Durch Zusatz von Carbonsäuren wurde die Atmung unterhalten. Obwohl bei dieser Anordnung nach dem Stoffwechselversuch keine CO_2-Bildung vorhanden war, setzte eine Zellvermehrung ein, die etwa 50—80% der Normalvermehrung betrug. (Das Zurückbleiben ist wahrscheinlich auf die infolge der Pufferwirkung der Carbonsäuresalze alkalischere Reaktion der Nährlösung zurückzuführen.) Von den zugesetzten Säuren wirkten vermehrungsinduzierend: Acetat, Citrat, Succinat, Glutaminat. Schwächer wirksam waren: Pyruvat, Fumarat, Alanin; ohne Wirkung blieben: Malat, β-Oxybutyrat, Glykokoll. Nur die vermehrungswirksamen Säuren wurden auch veratmet.

Um eine Orientierung über die minimal notwendige Atmungsgröße bei der Vermehrung zu erhalten, wurde Stoffwechsel und Vermehrung bei 20%igen und 2%igen Sauerstoff-Stickstoffgemischen verglichen. Bei 2% O_2 lag die Atmung nur bei 13% des Wertes von 20% O_2, während die Gärung verdoppelt war. Trotzdem der Energiegewinn bei 2% O_2 demnach nur ein Viertel so groß war wie bei 20% O_2, erwies sich die Vermehrung in beiden Fällen gleich groß.

Aus den Versuchen ergeben sich folgende Schlüsse: Der Energiebedarf der Zellvermehrung der Hefe ist gering. Da die durch Monojodacetat blockierte Glykolyse keinen Energiegewinn erbringt, bei gleichzeitiger Carbonsäureatmung aber Vermehrung eintritt, spielt die Glykolyse bei der Zellvermehrung energetisch keine Rolle; ihre Bedeutung muß demnach in der Lieferung vermehrungswirksamer Substanzen liegen. Nach dem Sitz des Jodacetatblocks kommt dafür außer der Einschleusung von Phosphat in das Zellinnere vor allem der Gluconsäureweg in Betracht, der zur Bildung von Ribose führt. Die Veratmung der Carbonsäuren liefert Vermehrungsenergie und erzeugt Zellwachstum, vielleicht über die Bildung von Aminosäuren aus den Ketosäuren des Dicarbonsäurecyclus.

Versuche mit Urethan zeigten bei 2% eine Hemmung der Vermehrung um 50%, wobei die Atmung um etwa 40%, die aerobe Glykolyse um

20% gehemmt war. Da im unbeeinflußten Ansatz die Vermehrungsgeschwindigkeit bei 15% Atmung (s. oben) noch maximal war, muß der Ansatzpunkt des Urethans im „Vermehrungsstoffwechsel der Glykolyse" gesucht werden.

H. Berger und H. Höller (Wien): Zur spasmolytischen Wirkung von Succus Liquiritiae

Im Rahmen experimenteller Untersuchungen über die Wirkung von Succus Liquiritiae gegenüber künstlich erzeugten Magengeschwüren bei Ratten wurde auch die spasmolytische Wirkung einer Reihe von Handelssorten am isolierten Darm bestimmt. Die Werte der muskulotropen Spasmolyse lagen für die verschiedenen Sorten zwischen 1:450 und 1:3100 (im Vergleich zu Papaverinchlorhydrat). Parallel wurde der Gehalt an Glycyrrhizinsäure nach der Methode von Fuchs u. Trauner-Adelpoller bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, daß zwischen Spasmolyse und Glycyrrhizingehalt keine Zusammenhänge bestehen und somit die Angabe, daß die Glycyrrhizinsäure für die spasmolytischen Effekte verantwortlich sei, zu Unrecht besteht. Außerdem kann der spasmolytische Wirkstoff nicht, wie Schulze feststellte, nur 1/1000 der Wirkung des Papaverins besitzen, da sonst die Droge mehr als 100% des Wirkstoffes enthalten müßte, wenn man nicht das Vorhandensein von Synergisten annimmt, für das es jedoch unseres Wissens keinen Anhaltspunkt gibt.

(Mrs.) A. Chatterjee (Calcutta), M. L. Chatterjee (Calcutta) und H. F. Häusler (Graz): Versuche zur biologischen Einstellung von Leberextrakten

Die durch Phenylhydrazinhydrochlorid (PHH) erzeugte Anämie bei Mäusen eignet sich zur Einstellung von Leberextrakten, wobei nicht nur der Gehalt an Vitamin B_{12}, sondern auch an anderen aktiven Fraktionen getestet werden kann. Folgende Methode hat sich am vorteilhaftesten erwiesen: Gruppen von je 10 Mäusen zeigen 48 Std nach intraperitonealer Injektion von PHH 30 mg/kg, 60 mg/kg und 120 mg/kg einen Erythrocytenabfall von 17,2%, 47,1% und 65,8%, woraus sich nach der üblichen graphischen Methode (Log. Dosis gegen %-Verminderung) ein Erythrocytenabfall von 50% (ER 50) bei 67 mg/kg PHH ergibt; in ähnlicher Weise wurden die ER 50-Werte für 96 Std und 192 Std als parallele Gerade zum 48-Std-Wert erhoben. Die gegenüber diesen Kontrollen mit verschiedenen Mengen 1—3mal applizierter Leberextrakte behandelten Gruppen ergaben ein zur biologischen Einstellung verwertbares Dosis-Wirkungsprozentsatz-Diagramm.

Ferner wurde untersucht, ob durch Leberextrakte die nach Adrenalininjektion auftretende Fettinfiltration der Leber und Lipoidablagerung in den Nebennieren beeinflußt werden kann: Bestimmt wurde der Gesamtätherextrakt der Leber, der bei den Kontrollen 3,7 $\pm$ 0,4/100 mg Leber betrug und nach 24 täglichen s.c. 30 μg Adrenalininjektionen auf 16,0 $\pm$ 1,4/100 mg Leber gestiegen war, sowie die prozentuelle Gewichtsveränderung der Nebennieren; beides konnte durch Leberextraktinjektionen quantitativ antagonisiert, ja sogar zur Norm gebracht werden, so daß auch hier die Möglichkeit einer biologischen Einstellung gegeben ist. Differentialdiagnostische Aufarbeitung des „Leberfettes" sowie mikroskopische und andere Nebennierenuntersuchungen sind im Gange, ebenso Versuche über die Beeinflussung der Adrenalin-induzierten Stoffwechseländerung durch Ergotamin.

H. Langemann (Zürich): Bestimmungen von Fermentaktivitäten in Geweben eines Falls von metastasierendem Karzinoid

Aminosäuredecarboxylase-, Aminoxydase- und Cholinesteraseaktivitäten wurden in Nierenrinden-, Leber- und Lebermetastasengewebe eines Falles von metastasierendem Dünndarmcarcinoid des Menschen bestimmt. Die Gewebe wurden in 0,25 m Rohrzuckerlösung homogenisiert und dann fraktioniert zentrifugiert. Für die Decarboxylase und die Cholinesterase wurden Präparate verwendet, die sich vorwiegend aus den kleinen Granula und den ungeformten Cytoplasmabestandteilen zusammensetzten. Für die Aminoxydase wurden Mitochondrienpräparate verwendet. Die in den einzelnen Versuchsansätzen von 2 ml verwendeten Gewebepräparate enthielten in der Regel 100—200 μMol Stickstoff. Alle Fermentaktivitäten wurden manometrisch, bei 37° C in der Warburg-Apparatur gemessen. Die im folgenden angegebenen Werte sind Quotienten, gebildet aus den μMol CO_2 (bei Decarboxylase und Cholinesterase) oder μMol Sauerstoff (verbraucht bei Aminoxydase), berechnet auf eine Versuchsdauer von 60 min, pro μMol Stickstoff (in den Versuchsansätzen enthalten). Es sind die Werte aus Einzelversuchen, wie sie aus wiederholten Versuchen aus dem gleichen Sektionsmaterial als typisch erschienen.

Für die Decarboxylase ergaben sich in einem Versuch mit $2 \cdot 10^{-3}$ m L-Dopa als Substrat bei p_H 7,0 folgende Werte: Leber 0,0003 und 0,001; Nierenrinde 0,005 und 0,022; Metastase 0,084 und 0,080 (zweite Zahlen jeweils in Gegenwart von 10^{-4} m Pyridoxalphosphat als Coferment). In einem anderen Versuch ergab Metastase 0,020 und 0,164 für Dopa als Substrat und 0,017 und 0,026 für $4 \cdot 10^{-3}$ m DL-5-Oxytryptophan als Substrat (zweite Zahlen jeweils in Gegenwart von 10^{-5} m Pyridoxalphosphat). In mehreren Versuchen zeigte es sich, daß der Abbau von 5-Oxytryptophan durch die Gegenwart von Pyridoxalphosphat beschleunigt wurde, jedoch weniger stark als bei Dopa als Substrat, außerdem stärker bei p_H 6,9 als bei p_H 8,1.

Bei der Aminoxydase betrugen die Werte in einem Experiment für die einzelnen Substrate Tyramin-HCl, 5-Oxytryptamin-HCl und Trypt-

amin-HCl (alle in einer Konzentration von 10^{-2} m) in dieser Reihenfolge bei Nierenrinde 0,025 / 0,028 / 0,020; bei Leber 0,062 / 0,050 / 0,037; bei Metastase 0,011 / 0,012 / 0,007. In einem anderen Experiment fand sich für Tyramin eine noch kleinere, relative Fermentaktivität in Metastase gegenüber Leber und Nierenrinde. In der Mehrzahl der Experimente wurden Oxytryptamin etwas weniger rasch und Tryptamin bedeutend weniger rasch abgebaut als Tyramin.

Für die Cholinesterase betrugen die Werte bei 10^{-2} m Acetylcholin-Cl als Substrat in einem der Experimente für Nierenrinde 0,004; Leber 0,004; Metastase 0,184. In einem anderen Experiment war die Aktivität in Metastase relativ und absolut noch höher. Eserin in $5 \cdot 10^{-7}$ m hemmte die Aktivität vollständig in allen drei Geweben. Bei Angebot von Acetyl-β-methylcholin-Cl oder von Benzoylcholin-Cl wurde nur das letztere von Metastasengewebe rasch gespalten, was für die Charakterisierung des Enzyms als unspezifische Cholinesterase spricht.

Wenn diese „in vitro" Versuchsresultate für Vorstellungen über „in vivo" Vorgänge benützt werden, so läßt sich aus der auffallend aktiven Decarboxylase des Metastasengewebes, die sehr viel aktiver als die in Leber oder Nierenrinde ist, schließen, daß in den Carcinoidmetastasen selber eine bedeutende Produktion von Oxytryptamin stattfinden kann, sofern das entsprechende Substrat 5-Oxytryptophan angeboten wird.

Aus der relativ geringen Aminoxydaseaktivität in Metastase, besonders verglichen mit der von Lebergewebe, ließe sich dann das Bestehenbleiben großer Oxytryptaminmengen in Metastasengewebe verstehen. Was die stark erhöhte Aktivität an unspezifischer Cholinesterase in Metastase betrifft, so kann ihr keine Erklärung zugeordnet werden, solange nicht mehr über die physiologische Bedeutung dieses Ferments bekannt ist.

J. Hamacher (Köln): Laufende, direkte Anzeige und Registrierung der Häufigkeit beliebiger Vorgänge

Mit 1 Textabbildung

Bei vielen Untersuchungen konzentriert sich die Aufmerksamkeit weniger auf das einzelne Phänomen als auf die Anzahl gleichartiger Vorgänge innerhalb einer bestimmten Zeitspanne.

Herzschlag-, Puls-, Atemfrequenz, Tropfenzahl, Motilität, Aktivität sowie mechanische, optische oder elektrische Impulse werden bevorzugt in Relation zur Zeit erfaßt. Die hierzu üblicherweise benutzten Ordinatenschreiber sind aufwändige Spezialapparaturen, deren Kombination mit Registriergeräten, insbesondere mit Mehrfach-Elektrokardiographen auf erhebliche Schwierigkeiten stößt.

Ein sehr einfaches Verfahren, das zunächst zur laufenden Pulsfrequenzmessung angegeben wurde (Hamacher), gestattet die fortlaufende, direkte Anzeige und Registrierung der Häufigkeit beliebiger Vorgänge.

Jeder einzelne Vorgang wird auf geeignete Weise zur Steuerung eines Relais bzw. eines Thyratrons mit einstellbarer Kontaktdauer bzw. Stromflußzeit herangezogen, das seinerseits den Heizwendel eines „Zwerg-NTC-Widerstandes mit Heizwendel[1]“ an eine regelbare Stromquelle legt. Aus der Erwärmung der keramischen Widerstandssubstanz, die einen ausgeprägt negativen Temperaturkoeffizienten (NTC = *N*egativer *T*emperatur-*C*oeffizient) besitzt, resultiert eine Widerstandsänderung.

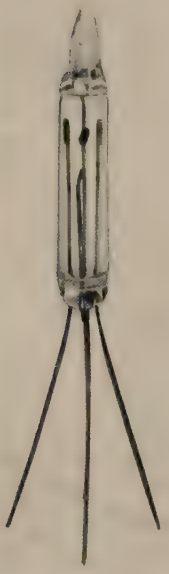


Abb. 1. „Zwerg-NTC-Widerstand mit Heizwendel“ (Originalgröße). In der evakuierten Glasröhre befindet sich das kaum senfkorngroße eigentliche System aus keramischer Widerstandssubstanz und Heizwendel. Beide sind voneinander isoliert und über feine Platindrähte mit den nach außen führenden Anschlüssen verbunden. (Ein vierter Anschluß wird durch den mittleren Draht teilweise verdeckt)

Die Wahl des Kaltwiderstandswertes, die Ein- bzw. Ausschaltdauer, die Stromstärke und eventuell die Kurvenform der für jeden zu zählenden einzelnen Vorgang exakt gleichen Heizimpulse gestatten eine Anpassung dieses Meßprinzips an die jeweilige Forderung. Die geringe Wärmeträgheit des kaum senfkorngroßen Systems bewirkt eine Integration über eine bestimmte Zeitspanne, so daß einzelne anomale Werte das Meßergebnis nicht entstellen.

Der jeweils resultierende Widerstandswert und seine Änderung kann nach üblichen Verfahren gemessen, laufend angezeigt und registriert werden. Die galvanische Trennung von Heizwendel und Widerstandskörper erleichtert dies wesentlich. Der Verlauf der Eichkurve kann zusätzlich beeinflußt werden, indem je ein Ohmscher Widerstand dem NTC-Widerstand in Serie und der Reihenschaltung parallel geschaltet wird. Die Skala des Anzeigeinstrumentes bzw. die Ordinate des Registrierstreifens kann z. B. in „pro Min.“ geeicht und somit die Häufigkeit des interessierenden Vorganges laufend unmittelbar abgelesen werden.

Will man an Elektrokardiographen, eventuell zusammen mit anderen Meßwerten laufend registrieren, so wird man zunächst den Eingangswiderstand und die Empfindlichkeit des EKG-Verstärkers herabsetzen. Hierzu kann man einen entsprechend

[1] VALVO G.m.b.H., Hamburg 1. Typ B8 320 15P . . . K.

niederohmigen Regelwiderstand zwischen die beiden EKG-Anschlußleitungen L und R für die Arme legen, dessen Schleifer mit der EKG-Anschlußleitung N (Erde) für das rechte Bein verbunden wird; mit diesem Schleifer wird dann einmalig auf gleiche Empfindlichkeit beider Zweige des EKG-Verstärkers abgeglichen. Dann legt man in jede der beiden EKG-Anschlußleitungen L und R für die obere Extremität je einen gleichen NTC-Widerstand und verbindet dahinter über einen hochohmigen Regelwiderstand; zwischen dessen Schleifer und die EKG-Anschlußleitung N für das rechte Bein speist man eine geringe Wechselspannung ein, z. B. 50 Hz Netzfrequenz, die einem kleinen Abwärtstransformator entnommen werden kann, und justiert mit dem zuletzt erwähnten Schleifer auf Stillstand des Schreibzeigers. Der Ableitungswahlschalter muß hierzu in Stellung 1. Ableitung gebracht und darin belassen werden.

Beim Aufheizen des Heizwendels eines der beiden NTC-Widerstände — der andere dient zur Kompensation auch bei schwankender Umgebungstemperatur — entsteht eine Unsymmetrie der Schaltung, die den Schreibzeiger bzw. Lichtstrahl wie bei einer Wechselstromstörung oscillieren läßt. Die Höhe dieser Oscillationen bzw. die Höhe des registrierten Wechselstrombandes gibt unmittelbar die Höhe der Frequenz des Vorganges an. Diese Form der Schreibung und ihre Auswertung gleicht der früher zur Druckregistrierung hinter einem induktiven Verlagerungsaufnehmer angegebenen „Amplitudengetreuen Silhouettenschreibung“ (Hamacher u. Vater).

Das geschilderte Registrierprinzip, die unmittelbare Aufzeichnung einer vom Meßvorgang amplitudenmodulierten Trägerfrequenz an Elektrokardiographen, bevorzugt Direktschreibern, ist bei sinngemäßer Anpassung der Schaltung vorteilhaft geeignet zur laufenden Aufzeichnung vielfältiger statischer und dynamischer Meßgrößen.

Literatur

Hamacher, J.: Ein einfaches Prinzip der elektrischen Messung und Registrierung von Herz- und Pulsschlagfrequenz. II. Internationaler Angiologen-Kongreß Fribourg (Schweiz) 1955. — Hamacher, J., u. W. Vater: Einfache, amplitudengetreue Druckregistrierung an Direktschreibern und Oscillographen. XX. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft Bonn 1953. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 163—166 (1954).

D. Demonstrationen

H. Kaller (Göttingen): Die Technik der intraarteriellen Infusion am oberen Halsganglion der Ratte

Der Orbitalmuskel der Ratte wird über das obere Halsganglion sympathisch innerviert. Bei Reizung des Halssympathicus kommt es zur Kontraktion des Muskels und damit zur Protrusion des Augapfels. Diese Protusion läßt sich gut registrieren.

In Erweiterung früherer Versuche[1], bei denen die zu prüfenden Substanzen *lokal* auf das Ganglion appliziert wurden, wurde eine Versuchstechnik entwickelt, bei welcher die intraarterielle Infusion möglich ist.

Die Infusionskanüle wird in die Carotis communis eingebunden, die Carotis externa und ihre Seitenäste (A. thyreoidea sup. und A. occipitalis) werden unterbunden. Die Blutversorgung des Ganglion erfolgt retrograd über die Anastomosen des Schädelinneren (Circulus WILLISII) und die Carotis interna. Wird die zu untersuchende Lösung mit geeigneter Geschwindigkeit infundiert (0,01—0,03 ml/min), so wird die Blutsäule in der Carotis interna zurückgedrängt, und das Ganglion wird damit von unverdünnter Infusionslösung durchströmt. So ist eine exakte Angabe der am Ganglion wirkenden Konzentrationen möglich. Nach Abstellen der Infusion wird das Ganglion wieder durchblutet.

Um zu verhindern, daß überschüssige Infusionslösung direkt am Orbitalmuskel wirken kann, wird in einer Voroperation die A. pterygopalatina verschlossen. Dieses Gefäß entspringt unterhalb der Schädelbasis aus der Carotis interna und versorgt dann unter anderem die gesamte Orbita.

Die untere Grenze der Nachweisbarkeit einer blockierenden Wirkung liegt für Hexamethonium bei $5 \cdot 10^{-6}$ bis $2 \cdot 10^{-5}$, für Nicotin bei $2 \cdot 10^{-6}$ bis $5 \cdot 10^{-6}$. Erregende Nicotinwirkungen können am Halsganglion der Ratte nicht nachgewiesen werden.

H. Wohnlich (Homburg): Photometrie von Zucker-Farbreaktionen auf Papier

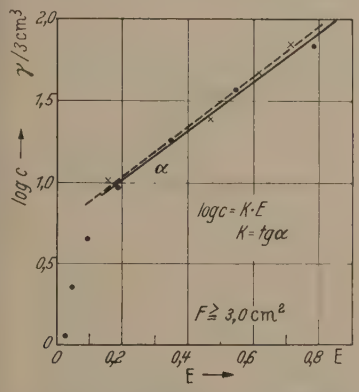
Mit 4 Textabbildungen

Es wurde mit Hilfe des Zeißschen Stufenphotometers geprüft, ob sich wie in Farblösungen auch für Zuckerfarbreaktionen auf Schl. & Sch.-Papier (2040a) eine Gesetzmäßigkeit zwischen Konzentration und Extinktion ergeben würde. Anstatt Farblösungen in Küvetten auszuphotometrieren, wurde das Papier mit Zuckerfarbflecken (z. B. Benzidin-Formazan und Phosphormolybdänblaufärbung, letztere für Fructose)

[1] Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 104, 474 (1955).

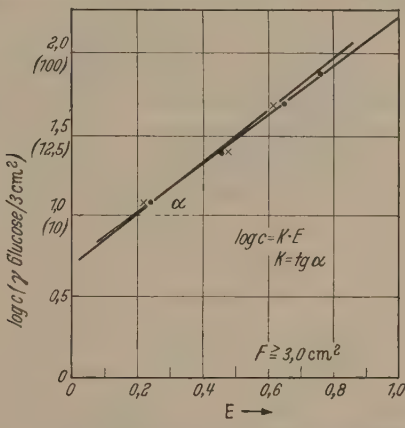
in den Küvettenhalter geklemmt; als Leerwert diente das besprühte Papier ohne Zucker. Als Filter wurde für Benzidin und Formazan L_2 (grün), für Phosphormolybdänblau S_{57} (gelb) verwendet.

Der Farbflecken kann entweder die Öffnung für das Strahlenbündel gerade ausfüllen (3 cm² als Eichwert der Kurven), er kann größer, aber auch kleiner sein.



•——• Glucose ×---× Galaktose

Abb. 1. Abhängigkeit von Extinktion und Konzentration für Glucose und Galaktose allein (Benzidin) vgl. Abb. 2



•——• Glucose ×---× Glucose aus Gemisch

Abb. 2. Abhängigkeit von Extinktion und Konzentration nach papierchromatographischer Trennung von Glucose aus Fructose-Glucose-gemischen (Benzidin)

Ist er größer, so kann unabhängig von der Form der Farbfläche und der Verteilung der Moleküle innerhalb gewisser Grenzen, der gesuchte Extinktionswert c_1 nach folgender Formel berechnet werden: $c_1/c_2 = F_2/F_1$. Hier bedeutet: F_1 die Fläche des Probetropfens = Eichfläche von 3 cm², wenn die Fläche das Strahlenbündel eben ausfüllt, F_2 die neue größere Fläche, c_2 den gemessenen Extinktionswert. Der Eichwert für c_2 ist also mit dem vergrößernden Faktor F_1/F_2 zu multiplizieren.

Abb. 1 zeigt Eichkurven für Glucose und Galaktose in Lösungen verschiedener Konzentration. Von diesen wurden je 0,02 cm³ mit Blutzuckerpipette in Kreisflächen aufgetragen, an der Luft getrocknet und mit den entsprechenden Reagentien die Farben entwickelt (s. ausführl. Mitt.). Bis zum Übergang der Krümmung in die Gerade (Ordinate zeigt die log der Konzentration c auf Millimeterpapier) bei etwa 10 γ gilt das Beersche Gesetz, von da ab die Beziehung $\log c = E \cdot K$, wobei K eine Konstante darstellt, die für die einzelnen Farben charakteristisch ist. Die Verschiebung gegenüber dem 0-Punkt (s. ausführl. spät. Mitt.) wird noch durch eine Konstante b gekennzeichnet, so daß die Kurve der allgemeinen Beziehung $y = a\,x + b$ genügt. Ein analoges Bild ergab sich für Formazan (rote Farbe im Gegensatz zu braun bei Benzidin). Hier gilt das Beersche Gesetz in einem wesentlich kürzeren Bereich von 0 bis etwa 4,5 γ.

Unter denselben Bedingungen wurde für Glucose nach chromatographischer Trennung aus dem Gemisch mit Fructose dieselbe Kurve erhalten (Abb. 2).

Für Phosphormolybdänblau gilt das Beersche Gesetz, wie die Geradlinigkeit der Kurve ausdrückt, in einem Bereich von 0—100 γ (numerische Konzentrationswerte auf der Ordinate) (Abb. 3).

Das Beersche Gesetz gilt also offensichtlich um so länger, je kurzwelliger der Bereich ist, dem die jeweilige Farbe angehört.

Bei *konstanter Fläche* sind in verschiedenen Flächenbereichen, auch

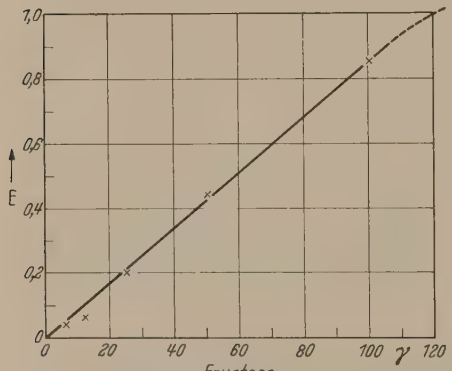


Abb. 3. Abhängigkeit von Extinktion und Konzentration bei Phosphormolybdänblauflecken (Fructose)

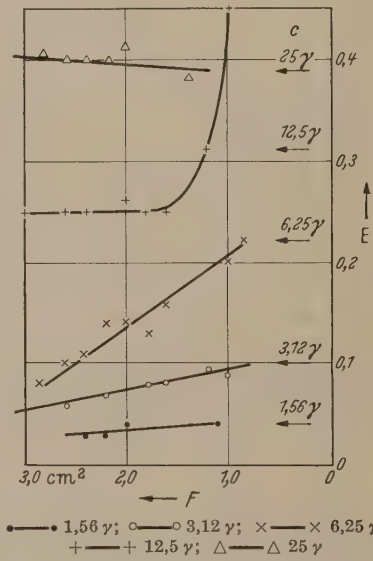


Abb. 4. Extinktion E als Funktion der Fläche F bei konstantem c (γ Glucose) für verschiedene c-Bereiche

wenn diese kleiner als der Strahlenbündelquerschnitt sind, keine Abweichungen von dem Gesetz $\log c = E \cdot K$ beobachtet worden.

Bei *ein- und derselben Konzentration*, auf verschieden große Flächen verteilt, bleibt beispielsweise bei 25 γ/Flecken die Fläche, auch wenn sie nah bis 1 cm² absinkt, auf die Extinktion praktisch ohne Einfluß. Dies gilt noch für den Wert 12,5 γ, wenngleich hier bei den Flächenwerten ab 1—1,5 cm² nach unten schon eine merkliche Zunahme des Extinktionswertes zu verzeichnen ist. Bei ganz kleinen Werten von 3 bis 1,6 γ Glucose wird der Einfluß der abnehmenden Fläche auf den E-Wert wieder geringer (Abb. 4).

Praktisch kommen für die Chromatographie meist ohnehin nur Flächen in Frage, die größer als der Flächenquerschnitt sind (im vorliegenden Fall 3 cm²). Im übrigen hat man es in der Hand, Form und Größe des Tropfens des zu analysierenden Gemisches so zu wählen, daß nach der Chromatographie für die photometrische Auswertung optimale Flächen entstehen.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 251—270 (1956)

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. Schoen)

Der Einfluß von Digitalisglykosiden auf das Glomerulusfiltrat, die Wasser- und Elektrolytausscheidung der Niere und die Plasmaelektrolyte bei Herzinsuffizienz*

Von

Ewald Göltner, Rosemarie Koch und Max Schwab

(Eingegangen am 3. Oktober 1955)

Nach den heutigen Vorstellungen kann eine vermehrte Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten entweder über eine Steigerung des Glomerulusfiltrats oder über eine Verminderung der Rückresorption in den Tubuluszellen der Niere oder durch eine Kombination beider Vorgänge erreicht werden.

Die verminderte Ausscheidung von Wasser und Elektrolyten bei Herzinsuffizienz wurde zunächst auf die verminderte Filtration zurückgeführt (Merrill; Mokotoff, Ross und Leiter). Inzwischen haben aber Untersuchungen von Newman, Davis und Shock, Heller und Jacobson sowie Davies und Kilpatrick klargestellt, daß mindestens im Beginn der kardialen Ödembildung der vermehrten Rückresorption entscheidende Bedeutung zukommt. Für die *Erklärung der diuretischen Wirkung der Digitalisglykoside* war daher die *Bestimmung des Glomerulusfiltrats von besonderer Bedeutung.* Bei einigen diesbezüglichen Untersuchungen wurden im Zustand der Herzinsuffizienz und später nach wiederhergestellter Kompensation Glomerulusfiltrat und renaler Plasmafluß bestimmt. Die Kompensation wurde dabei durch Bettruhe, salzbeschränkte Kost und Digitalisglykoside erreicht. Sinclair-Smith u. Mitarb. (1949) sahen keine Veränderung des Glomerulusfiltrates. Auch Heller und Jacobson (1950) stellten in 2 von insgesamt 4 untersuchten Herzinsuffizienzen keine Steigerung des Glomerulusfiltrates fest. Dagegen fanden Eichna u. Mitarb. (1953) bei 8 Patienten nach erreichter Kompensation in jedem Fall eine Steigerung der Filtratmenge, die im Mittel 37% betrug.

Diese bisher genannten Untersuchungen sind nicht ohne weiteres als Beweise für einen eventuellen Einfluß der Digitalisglykoside zu verwerten, da bei der Mehrzahl der untersuchten Fälle der zeitliche Abstand zwischen der Untersuchung im Zustand der Herzinsuffizienz und nach wiederhergestellter Kompensation verhältnismäßig groß war. Von größerer Beweiskraft sind die Befunde von Eichna, Farber, Berger u. Mitarb. sowie Farber, Alexander, Pellegrino und Earle. Diese Autoren bestimmten das Glomerulusfiltrat und die renale Wasser- und Elektrolytausscheidung bei 5 bzw. 10 herzinsuffizienten Patienten nach i.v. Gabe

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

von 1,0—1,5 mg Digoxin. Sie sahen zwar in allen Fällen eine vermehrte Wasser- und Elektrolytausscheidung im Harn, das Glomerulusfiltrat stieg aber trotz der hohen Digitalisdosis keineswegs bei allen Patienten an. Die Autoren nahmen eine Verminderung der Rückresorption als Ursache der vermehrten Wasser- und Elektrolytausscheidung an, ließen aber die Frage offen, ob diese durch einen unmittelbaren Angriff der Digitalisglykoside an den Tubuluszellen zustandekommt oder indirekt, etwa über eine verminderte Freisetzung rückresorptionsfördernder Stoffe, z. B. von Nebennierenrindenhormonen, entsteht.

Die Untersuchungen von Seymour u. Mitarb. (1942) sowie Briggs u. Mitarb. (1948) können in diesem Zusammenhang nicht ohne weiteres herangezogen werden, da die Autoren zur Beseitigung der Dekompensation Quecksilberdiuretica verwandten.

Bei diesen relativ spärlichen Befunden, die überdies zum Teil mit ungewöhnlich hohen Digitalisdosen gewonnen wurden, schien eine erneute Bearbeitung des Themas gerechtfertigt. Es war dabei nötig, auch das Verhalten der *Plasmaelektrolyte* zu verfolgen. In 2 vorausgegangenen Arbeiten (Dörrie, Göltner und Schwab; Göltner und Schwab) ist über den Abfall der Natrium- und Anstieg der Kaliumkonzentration im Plasma nach Strophanthin bzw. Digitoxin bei Herzgesunden berichtet worden. Auffälligerweise finden sich im bisherigen Schrifttum kaum diesbezügliche Angaben. Lediglich Stockton sah bei herzgesunden und herzinsuffizienten Patienten einen Abfall der Chloridkonzentration im Plasma nach Digitalisgaben.

Methodik

Die Untersuchungen wurden an 29 herzinsuffizienten Patienten männlichen und weiblichen Geschlechts durchgeführt. Bei einer *1. Gruppe von 18 Herzinsuffizienten* betrug die Vorbeobachtung im allgemeinen 3, in einigen sehr schweren Fällen nur 2 Tage. Während dieser Zeit hielten die Patienten Bettruhe ein und bekamen salzbeschränkte Kost. Anschließend wurde Digitoxin in folgender Dosierung verabreicht: 2 Tage lang je 0,6 mg, 2 Tage je 0,4 und anschließend 0,3 bzw. 0,2 mg als Erhaltungsdosis. Nur einige Patienten erhielten kleinere Dosen. Während dieser Zeit wurden täglich frühmorgens nüchtern Blutproben zur Bestimmung der *Plasmaelektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid* abgenommen. Außerdem erfolgte die Messung der *Wasser-, Natrium-, Kalium- und Chloridausscheidung im 24 Stunden-Harn*. Bei 12 Patienten dieser Gruppe wurde zusätzlich das *Glomerulusfiltrat* täglich bestimmt.

Die Messung von Natrium und Kalium erfolgte flammenphotometrisch, von Chlorid merkurimetrisch in der früher beschriebenen Weise. Die Chloridbestimmung stieß dabei mehrfach auf die von Asper, O. und S. Schales beschriebene Schwierigkeit. Wenn der Chloridgehalt im Harn sehr niedrig ist oder der p_H-Wert 7,0 übersteigt, kann bei Zusatz von Diphenylcarbazon oder Quecksilbernitrat eine rosa Farbe entstehen. Es muß dann tropfenweise 1 n HNO_3 bis zur Entfärbung zugefügt werden. Anschließend kann die Titration in gewohnter Weise erfolgen.

Das Glomerulusfiltrat wurde mit Hilfe der endogenen 24 Stunden-Kreatininclearance (Schwab) bestimmt.

Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit mit kurzfristigen Versuchen erfolgt die Angabe der Elektrolytausscheidung in Mikroquivalent/Minute (μval/min).

Bei einer *2. Gruppe von 11 herzinsuffizienten Patienten* wurden im akuten Versuch dieselben Meßgrößen vor und nach *0,25* mg *K-Strophanthin* i.v. bestimmt.

Dabei folgten auf 3 Kontrollperioden 4 Perioden nach Strophanthin. Ihre Dauer betrug jeweils etwa 30 min. Vor der Strophanthingabe sowie 1 und 2 Std nachher wurden Blutproben zur Bestimmung der Plasmaelektrolyte entnommen.

In der *Digitoxingruppe* lag bei 5 Fällen eine essentielle Hypertonie vor. 3 hatten nur mäßige Zeichen von Links- und Rechtsinsuffizienz, 2 waren hochgradig dekompensiert. Eine arteriosklerotische Herzkrankheit hatten 3 Patienten; 2 waren nur geringfügig, 1 dagegen erheblich dekompensiert. An einem kombinierten Mitralfehler litten 4 Patienten; abgesehen von 1 hatten sie deutlich ausgeprägte Zeichen von Rechts- und Linksinsuffizienz. In 1 Fall lag eine Aortenstenose, in 1 Fall eine Aorteninsuffizienz vor. Beide Patienten zeigten ausgeprägte Zeichen einer Linksinsuffizienz, während nur geringe Erscheinungen von Rechtsinsuffizienz vorlagen. 2 Patienten litten an einem Cor pulmonale mit nur geringen Dekompensationszeichen. In 1 Fall lag eine schwere adhaesive Pericarditis mit ausgeprägten Stauungszeichen im kleinen und großen Kreislauf vor. 1 Patientin hatte eine schwere Herzinsuffizienz im Rahmen einer Hyperthyreose.

In der *Strophanthingruppe* litten 4 Patienten an einer arteriosklerotischen Herzkrankheit; 2 zeigten geringe, 2 ausgeprägte Insuffizienzzeichen des rechten und linken Herzens. Ein Cor pulmonale war bei 3 Fällen die Ursache der Dekompensation. Die 3 Patienten boten ausgeprägte Symptome von Herzinsuffizienz. Eine Hypertonie lag bei 2 Fällen vor. Beide Patienten hatten nur geringe Zeichen von Links- und Rechtsinsuffizienz. In einem Fall handelte es sich um eine schwere Herzinsuffizienz bei Hyperthyreose. 1 Fall hatte einen kombinierten Mitralfehler mit mäßig ausgeprägten Dekompensationszeichen.

Besonderer Wert wurde auf die Erfassung der vor Klinikaufnahme durchgeführten Behandlung gelegt. Denn diese ist für die Beurteilung der Plasmaelektrolytveränderungen von entscheidender Bedeutung. Zusammenfassend kann man sagen, daß die 29 herzinsuffizienten Patienten vor der Klinikeinweisung mit unzureichenden Digitalisdosen oder überhaupt nicht mit Digitalisglykosiden behandelt wurden. Salzbeschränkte Kost und Quecksilberdiuretica hatten nur einzelne Patienten erhalten.

Als Digitoxinpräparat fand „Digimerck", als Strophanthinpräparat „Kombetin" (Boehringer) Verwendung.

Die *statistische Auswertung* erfolgte mit der Varianzanalyse und dem Fisherschen t-Test. In der Digitoxingruppe wurden für die varianzanalytische Auswertung die 3 Vorbeobachtungstage dem 2., 3. und 4. Tage unter Digitoxin gegenübergestellt. Dazu mußten in einigen Fällen Zahlenwerte eingesetzt werden, da die Messungen fehlten. Durch entsprechende Verminderung der Freiheitsgrade wurde diesem Sachverhalt Rechnung getragen. Bei den Plasmaelektrolyten erfolgte zusätzliche Auswertung mit dem t-Test. Dabei wurden die einzelnen Tage unter Digitoxin den Mittelwerten aus den Vorbeobachtungstagen gegenübergestellt.

In der Strophanthingruppe wurde die renale Wasser- und Elektrolytausscheidung mit der Varianzanalyse untersucht, für die Plasmaelektrolyte nur der t-Test verwandt.

Versuchsergebnisse

In Tab. 1 ist das Verhalten des *Harnflusses* und des *Glomerulusfiltrates der Digitoxingruppe* zusammengefaßt. Der vorher auf 0,40 am 1. Tag, 0,38 am 2. und 0,40 ml/min am 3. Tag erniedrigte Harnfluß steigt nach Digitoxin deutlich an und erreicht am 3. Tag der Digitoxinbehandlung fast das Doppelte des Ausgangswerts. Die varianzanalytische Auswertung in Tab. 2 zeigt, daß dieser Anstieg hoch signifikant ist.

Freilich erstreckt sich die Zunahme nicht auf alle untersuchten Patienten. Dies kommt in der signifikanten Wechselwirkung zwischen Versuchspersonen (Vpn.) und Digitoxin zum Ausdruck. Die vorliegenden Befunde sind daher zunächst nur für den Personenkreis dieser Untersuchungen

Tabelle 1. *Der Einfluß von Digitoxin auf Harnfluß und Glomerulusfiltrat bei 12 Fällen von Herzinsuffizienz*

Die Zahlenangaben sind Mittelwerte und mittlere Fehler der Mittelwerte

	Harnfluß	Glomerulusfiltrat
	ml/min	
1. Tag	0,40 ±0,06	69,3 ±6,43
2. Tag	0,38 ±0,04	73,1 ±5,93
3. Tag	0,40 ±0,05	71,5 ±10,12
4. Tag 0,6 mg Digitoxin	0,45 ±0,03	69,3 ±5,40
5. Tag 0,6 mg Digitoxin	0,62 ±0,11	72,8 ±5,65
6. Tag 0,4 mg Digitoxin	0,76 ±0,18	71,5 ±6,50
7. Tag 0,4 mg Digitoxin	0,70 ±0,16	69,6 ±5,41
8. Tag 0,3 mg Digitoxin	0,78 ±0,22	67,6 ±3,97

Tabelle 2. *Varianzanalytische Auswertung für Glomerulusfiltrat (ml/min) und Harnfluß (ml/min) der Digitoxingruppe*

Bestandteile der Streuung	f	$F = \frac{\text{Untersuchtes Streuungsquadrat}}{\text{Zufalls-Streuungsquadrat}}$	
		Glomerulusfiltrat	Harnfluß
Versuchspersonen	11	25,58***	33,09***
Digitoxin	1	0,11	128,98*** 4,67†
Tage	2	0,10	1,19
Wechselwirkungen			
Versuchspersonen — Digitoxin	11	1,59	27,64***
Versuchspersonen — Tage	22	1,20	4,37**
Digitoxin — Tage	2	0,99	31,96***

* signifikant für 5%-Grenze.
** signifikant für 1%-Grenze.
*** signifikant für 0,1%-Grenze.
† getestet gegen das Wechselwirkungs(Versuchspersonen-Digitoxin)-Streuungsquadrat.

gültig. Die Testung gegen das Wechselwirkungs (Vpn.-Digitoxin)-Streuungsquadrat ergibt keine Signifikanz, wenn auch der F-Wert für die 5%-Grenze mit 4,84 sehr nahe an 4,67 liegt. Man wird also mit der Übertragung der Befunde auf einen anderen Personenkreis zurückhaltend sein müssen. Es kommt hierin die klinische Erfahrungstatsache zum Ausdruck,

daß nur ein Teil der herzinsuffizienten Patienten auf Digitalisbehandlung mit Ödemausscheidung reagiert. Von der Anzahl dieser günstig reagierenden Fälle in einer Untersuchungsgruppe wird es abhängen, ob

Tabelle 3. *Der Einfluß von Strophanthin auf Harnfluß und Glomerulusfiltrat bei 8 Fällen von Herzinsuffizienz*

Zahlenangaben wie in Tab. 1

		Harnfluß ml/min	Glomerulusfiltrat ml/min
vor Strophanthin	1. Clearance-periode	0,63 ±0,08	100,4 ±12,52
	2. Clearance-periode	0,66 ±0,09	88,8 ±10,51
	3. Clearance-periode	0,60 ±0,09	77,3 ± 8,67
nach 0,25 mg Strophanthin	1. Clearance-periode	0,56 ±0,06	86,5 ±10,19
	2. Clearance-periode	0,61 ±0,12	85 7 ± 8,23
	3. Clearance-periode	0,57 ±0,08	81,4 ± 9,85
	4. Clearance-periode	0,55 ±0,07	87,9 ± 9,86

Tabelle 4. *Varianzanalytische Auswertung für Glomerulusfiltrat (ml/min) und Harnfluß (ml/min) der Strophanthingruppe*

Bestandteile der Streuung	f	$F = \frac{\text{Untersuchtes Streuungsquadrat}}{\text{Zufalls-Streuungsquadrat}}$	
		Glomerulusfiltrat	Harnfluß
Versuchspersonen	7	22,74***	7,27***
Strophanthin	1	3,83 1,61†	1,24
Perioden	2	2,08	0,53
Wechselwirkungen			
Versuchspersonen — Strophanthin	7	2,39*	6,65***
Versuchspersonen — Perioden . .	14	1,13	0,71
Stophanthin — Tage	2	1,24	0,34

† getestet gegen das Wechselwirkungs(Versuchspersonen-Strophanthin)-Streuungsquadrat.

neben einer signifikanten Wechselwirkung auch ein signifikanter Haupteffekt auftritt. Die signifikante Wechselwirkung zwischen Digitoxin und Tagen bedeutet, daß der Digitoxineinfluß an den verschiedenen Tagen

nicht gleichmäßig war. So betrug der Harnfluß am 1. Tag der Digitoxinbehandlung 0,45 ml/min und stieg am 2. Tag auf 0,62 und am 3. Tag auf 0,76 ml/min an. Man wird darin eine Folge der von Tag zu Tag zunehmenden Gesamtdosis sehen müssen.

Tabelle 5. *Der Einfluß von Digitoxin auf die renale Wasser- und Elektrolytausscheidung bei 18 Fällen von Herzinsuffizienz*

Zahlenangaben wie in Tab. 1

	Harnfluß ml/min	Natrium	Kalium	Chlorid
		µval/min		
1. Tag	0,41 ±0,05	57,0 ± 8,61	23,5 ±2,42	45,2 ± 7,39
2. Tag	0,37 ±0,03	52,4 ± 7,49	24,1 ±2,20	45,5 ± 6,89
3. Tag	0,39 ±0,03	46,7 ± 5,99	26,9 ±2,49	40,9 ± 5,04
4. Tag 0,6 mg Digitoxin	0,47 ±0,04	64,6 ± 7,61	29,8 ±1,84	60,6 ± 6,50
5. Tag 0,6 mg Digitoxin	0,59 ±0,08	79,5 ±12,61	31,4 ±1,89	76,5 ±11,58
6. Tag 0,4 mg Digitoxin	0,65 ±0,13	86,7 ±20,94	34,7 ±2,97	75,0 ±14,78
7. Tag 0,4 mg Digitoxin	0,61 ±0,11	72,6 ±15,72	34,9 ±2,52	72,6 ±15,73
8. Tag 0,3 mg Digitoxin	0,73 ±0,18	91,1 ±27,51	39,4 ±6,59	79,7 ±22,03

Tabelle 6. *Varianzanalytische Auswertung für Harnfluß (ml/min), Natrium-, Kalium- und Chloridausscheidung (µval/min) der Digitoxingruppe*

Bestandteile der Streuung	f	$F = \frac{\text{Untersuchtes Streuungsquadrat}}{\text{Zufalls-Streuungsquadrat}}$			
		Harnfluß	Natrium	Kalium	Chlorid
Versuchspersonen	17	5,41**	5,98***	3,77**	9,74***
Digitoxin	1	23,95*** 4,94†*	15,05*** 2,34†	30,40***	39,93*** 4,25†
Tage	2	0,01	0,58	1,19	0,10
Wechselwirkungen					
Versuchspersonen — Digitoxin	17	4,85***	6,43***	1,31	9,38***
Versuchspersonen — Tage . . .	34	0,53	0,77	0,89	0,87
Digitoxin — Tage	2	0,33	0,36	0,26	0,13

† getestet gegen das Wechselwirkungs(Versuchspersonen-Digitoxin)-Streuungsquadrat.

Das *Glomerulusfiltrat* war im Mittel fast auf die Hälfte der Norm herabgesetzt. Lediglich bei 4 Patienten, die nur leichte oder mittelschwere Zeichen von Herzinsuffizienz boten, war es normal. Interessanterweise blieb es *während der Digitoxinzufuhr praktisch unverändert*. Hieraus läßt sich auf eine *Verminderung der Rückresorption als Ursache der vermehrten Harnausscheidung* schliessen.

In Tab. 3 sind die entsprechenden Meßwerte der *Strophanthingruppe* aufgeführt. Es zeigt sich, daß nach 0,25 mg K-Strophanthin der Harnfluß von 0,62 (Mittelwert der 3 Vorperioden) auf 0,53 (Mittelwert

der 2.—4. Testperiode), das Glomerulusfiltrat von 91,3 auf 83,9 ml/min absinkt. Allerdings sind diese Veränderungen nicht signifikant (Tab. 4).

Bezüglich der signifikanten Wechselwirkungen zwischen Strophanthin und Vpn. gilt sinngemäß das oben Gesagte.

In Tab. 5 ist das Verhalten der *Wasser- und Elektrolytausscheidung der Digitoxingruppe* zusammengefaßt. Vor Digitoxin ist diese gegenüber den

Tabelle 7. *Der Einfluß von Strophanthin auf die renale Wasser- und Elektrolytausscheidung bei 11 Fällen von Herzinsuffizienz, davon 3 im Stadium der Ödemschwemmung*

Zahlenangaben wie in Tab. 1

Gruppe I (Vpn. 1—8)		Harnfluß ml/min	Natrium	Kalium	Chlorid
			μval/min		
vor Strophanthin	1. Periode	0,63 ± 0,08	81,9 ± 15,13	33,1 ± 4,68	81,6 ± 15,90
	2. Periode	0,66 ± 0,09	94,6 ± 21,20	33,4 ± 5,18	94,9 ± 21,18
	3. Periode	0,60 ± 0,09	85,8 ± 23,33	28,9 ± 4,94	91,4 ± 23,82
nach 0,25 mg Strophanthin i.v.	1. Periode	0,56 ± 0,06	71,2 ± 12,52	31,8 ± 3,67	77,4 ± 15,05
	2. Periode	0,61 ± 0,05	79,4 ± 13,95	35,7 ± 3,04	88,2 ± 17,84
	3. Periode	0,57 ± 0,08	69,0 ± 12,92	30,7 ± 3,62	76,8 ± 16,43
	4. Periode	0,55 ± 0,07	83,3 ± 15,57	34,2 ± 5,12	94,2 ± 19,76
Gruppe II (Vpn. 9—11)					
vor Strophanthin	1. Periode	2,66	223,9	73,1	231,0
	2. Periode	1,88	196,4	61,7	210,8
	3. Periode	2,15	199,8	62,6	211,6
nach 0,25 mg Strophanthin	1. Periode	2,84	284,9	80,2	312,5
	2. Periode	2,49	266,1	76,5	296,2
	3. Periode	2,48	258,5	73,1	291,6
	4. Periode	2,37	252,8	73,2	291,9

Normalwerten, die bei 17 herzgesunden Vpn. für Harnfluß 0,70 ml/min, für Natrium 77,1, für Kalium 34,3 und für Chlorid 89,5 μval/min betrugen (Göltner und Schwab), deutlich herabgesetzt. Unter Digitoxin steigt sie dann auf praktisch normale Werte an. Die varianzanalytische Auswertung in Tab. 6 zeigt, daß diese Unterschiede sämtlich hochsignifikant sind. Allerdings ist mit Ausnahme des Kaliums auch die Wechselwirkung zwischen Vpn. und Digitoxin gesichert. Da die Testung gegen das Wechselwirkungs-Streuungsquadrat nur im Falle des Harnflusses schwach signifikant ist, für Natrium und Chlorid aber nicht, wird man auch hier mit der Übertragung der Befunde auf einen anderen Personenkreis zurückhaltend sein müssen. Auffälligerweise war bei Kalium die Wechselwirkung zwischen Vpn. und Digitoxin nicht signifikant. Das bedeutet also ein gleichmäßiges Reagieren aller Patienten

unter Digitoxin. Die Interpretation dieses Befundes wird später gegeben werden.

In Tab. 7 sind Harnfluß, Natrium-, Kalium- und Chloridausscheidung unter *Strophanthin* zusammengestellt. Betrachtet man zunächst die Gruppe mit 8 Patienten, dann sinken, abgesehen von der Kaliumausscheidung, die anderen Meßgrößen geringfügig ab; doch sind diese Unterschiede statistisch nicht zu sichern (Tab. 8).

Tabelle 8. *Varianzanalytische Auswertung für Harnfluß (ml/min), Natrium-, Kalium- und Chloridausscheidung (µval/min) der Strophanthingruppe*

Bestandteile der Streuung	f	$F = \frac{\text{Untersuchtes Streuungsquadrat}}{\text{Zufalls-Streuungsquadrat}}$			
		Harnfluß	Natrium	Kalium	Chlorid
Versuchspersonen	7	7,27***	30,51***	22,73**	34,40***
Strophanthin	1	1,24	4,79* 0,78†	1,11	0,53
Perioden	2	0,53	0,08	1,32	0,03
Wechselwirkungen					
Versuchspersonen—Strophanthin	7	6,65***	6,19***	8,46***	4,99***
Versuchspersonen — Tage . . .	14	0,71	0,70	1,80	0,89
Strophanthin — Tage	2	0,34	1,71	2,43	1,61

† getestet gegen das Wechselwirkungs(Versuchspersonen-Strophantin)-Streuungsquadrat.

Interessanterweise tritt jedoch bei den Patienten, die sich schon vor der Untersuchung im Stadium der Ödemausschwemmung befanden, nach derselben Strophanthindosis eine zusätzliche Steigerung der Wasser- und Elektrolytausscheidung auf. Man gewinnt den Eindruck, daß im Zustand der Ödemausschwemmung die Tubuluszellen auf die Strophanthingabe mit einer Minderung der Rückresorption reagieren.

In Tab. 9 sind die Konzentrationen der *Plasmaelektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid vor und während der Digitoxinbehandlung* wiedergegeben. Die Natriumkonzentration ($[Na^+]$) lag mit 142,7 $\pm$ 0,993 mval/l im Bereich der Norm. Eine Hyponatriämie fand sich also nicht. Die Bedeutung dieses Befundes soll später besprochen werden. Auch $[K^+]$ und $[Cl^-]$ waren normal. Mit Beginn der Digitoxinverabreichung trat dann in zunehmendem Maße eine Verminderung von $[Na^+]$ und ein Anstieg von $[K^+]$ ein. Diese Veränderungen ließen sich sowohl mit Hilfe der Varianzanalyse (Tab. 10) als auch mit dem t-Test sichern. $[Cl^-]$ war lediglich am 4. Tag der Digitoxinverabreichung signifikant niedriger als während der Kontrolltage ($P < 0{,}01$).

In Tab. 11 sind die Meßwerte der *Strophanthingruppe* wiedergegeben. Sie wurden vor Strophanthin und 60 bzw. 120 min später

gewonnen. 3 Vpn. sind als besondere Gruppe aufgeführt, da sie sich bereits vor der Untersuchung im Stadium der Ödemausschwemmung befanden. Im Unterschied zu der Digitoxingruppe ergaben sich bei der Hauptgruppe von 8 Vpn. keine signifikanten Unterschiede gegenüber den

Tabelle 9. *Der Einfluß von Digitoxin auf die Plasmaelektrolyte Natrium, Kalium und Chloride bei 18 Fällen von Herzinsuffizienz*

Zahlenangaben wie in Tab. 1

	Natrium	Kalium	Chlorid
	mval/l		
1. Tag	142,7 ±0,993	4,08 ±0,099	105,7 ±1,192
2. Tag	142,1 ±1,179	4,14 ±0,095	105,7 ±1,292
3. Tag	142,0 ±1,256	4,17 ±0,097	106,2 ±1,063
4. Tag 0,6 mg Digitoxin	142,0 ±1,470 P > 0,05	4,37 ±0,102 P < 0,001	105,2 ±1,397 P > 0,05
5. Tag 0,6 mg Digitoxin	141,1 ±1,184 P = 0,05	4,35 ±0,100 P < 0,01	104,8 ±1,069 P > 0,05
6. Tag 0,4 mg Digitoxin	140,1 ±1,172 P < 0,01	4,38 ±0,093 P < 0,001	105,0 ±1,104 P > 0,05
7. Tag 0,4 mg Digitoxin	139,2 ±1,059 P < 0,01	4,39 ±0,107 P < 0,01	104,1 ±1,253 P < 0,01
8. Tag 0,3 mg Digitoxin	138,6 ±1,347 P < 0,01	4,47 ±0,152 P <0,05	101,3 ±1,062 P > 0,05

Tabelle 10. *Varianzanalytische Auswertung für Natrium-, Kalium- und Chloridkonzentration im Plasma (mval/l) der Digitoxingruppe*

Bestandteile der Streuung	f	$F = \frac{\text{Untersuchtes Streuungsquadrat}}{\text{Zufalls-Streuungsquadrat}}$		
		Natrium	Kalium	Chlorid
Versuchspersonen	17	38,87***	28,12***	24,19***
Digitoxin	1	40,63*** 12,55**†	53,48*** 22,45***†	2,67 1,06†
Tage	2	3,19	1,68	0,08
Wechselwirkungen				
Versuchspersonen — Digitoxin	17	3,23**	2,38*	2,52*
Versuchspersonen — Tage	34	1,66	1,23	0,80
Digitoxin — Tage	2	0,97	0,49	0,05

† getestet gegen das Wechselwirkungs(Versuchspersonen-Digitoxin)-Streuungsquadrat.

Werten vor Strophanthin. Die Betrachtung der Einzelwerte lehrt allerdings, daß [Na^+] sowohl nach 60 wie nach 120 min nur bei 2 Patienten zu-, bei 6 Patienten aber abnimmt. Bei den 3 Vpn. im Stadium der Ödemausscheidung fiel [Na^+] dagegen deutlich ab, während die Veränderungen für [K^+] und [Cl^-] nicht so ausgesprochen sind. Auch wenn man alle Vpn.

Tabelle 11. Der *Einfluß von Strophanthin auf die Plasmaelektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid bei 11 Fällen von Herzinsuffizienz, davon 3 im Stadium der Ödemausschwemmung*

Zahlenangaben wie in Tab. 1

Gruppe I (Vpn. 1—8)		Natrium	Kalium	Chlorid
		mval/l		
vor Strophanthin		146,4 ±1,81	4,14 ±0,21	108,9 ±1,81
nach 0,25 mg Strophanthin	1 Std	145,6 ±1,44 P > 0,05	4,14 ±0,18 P > 0,05	108,6 ±1,87 P > 0,05
	2 Std	145,8 ±1,99 P > 0,05	4,21 ±0,20 P > 0,05	108,6 ±1,85 P > 0,05
Gruppe II (Vpn. 9—11)				
vor Strophanthin		147,0	3,92	108,6
nach 0,25 mg Strophanthin	1 Std	145,5	3,96	108,0
	2 Std	143,1	3,87	107,7
Gruppe I u. II				
vor Strophanthin		146,5 ±1,64	4,08 ±0,16	108,8 ±1,41
nach 0,25 mg Strophanthin	1 Std	145,6±1,24 P > 0,05	4,09 ±0,15 P > 0,05	108,4 ±1,40 P > 0,05
	2 Std	145,1 ±1,63 P > 0,05	4,11 ±0,17 P > 0,05	108,3±1,44 P > 0,05

zu einer einheitlichen Gruppe zusammenfaßt, läßt sich keine Sicherung der Unterschiede vor und nach Strophanthingabe erzielen. Es ist möglich, daß bei einer Vergrößerung des untersuchten Personenkreises eine Signifikanz der Unterschiede herausgekommen wäre.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Die mitgeteilten Befunde und ihre statistischen Auswertungen zeigen, daß die *vermehrte Wasser- und Elektrolytausscheidung nach Digitoxin ohne Steigerung des Glomerulusfiltrats* zustandekommt. Sie muß also auf eine *Verminderung der tubulären Rückresorption* bezogen werden. Diese Befunde stimmen weitgehend, wenn auch nicht in allen Einzelheiten, mit jenen überein, die früher bei Herzgesunden erhoben wurden.

Der Unterschied gegenüber den Befunden von Eichna und Mitarb. sowie Farber und Mitarb., die im akuten Versuch häufig eine Steigerung des Glomerulusfiltrats beobachteten, ist wohl durch die unterschiedliche Dosierung der angewandten Digitalisglykoside zu erklären. Die genannten Autoren verwandten mit 1,0—1,5 mg Digitoxin i.v. eine bedeutend höhere Dosis, als sie in der klinischen Routinebehandlung gebräuchlich ist.

Es erhebt sich nun die *Frage, ob die Minderung der Rückresorption auf einen direkten Angriff der Digitalisglykoside an den Nierenepithelien* oder auf eine nur mittelbare Wirkung zurückzuführen ist. Letztere könnte man sich etwa so vorstellen, daß die im Zustand der Herzinsuffizienz vermehrte Freisetzung rückresorptionsfördernder Stoffe, z. B. Aldosteron (Axelrad u. Mitarb., Liddle u. Mitarb.), durch Verbesserung des Kreislaufs entfällt. Folgende Befunde sprechen jedoch für einen unmittelbaren Angriff an den Tubuluszellen. Einmal lassen sich dieselben Wirkungen auch am herzgesunden Menschen nachweisen, obwohl bei ihm das Herzminutenvolumen durch Digitalisglykoside nicht gesteigert, oft sogar vermindert wird und damit entgegengesetzte Kreislaufwirkungen erzielt werden. Ferner fand Gremels am Herz-Lungen-Nieren-Präparat einen Anstieg der Chloridausscheidung im Harn nach Digitalis.

Als *Grund für das Fehlen einer Steigerung der Wasser- und Elektrolytausscheidung bei der Strophanthingruppe* muß zunächst angeführt werden, daß die Dosis von 0,25 mg Strophanthin zu niedrig war. Bei den früher berichteten Untersuchungen am Herzgesunden waren 0,35 mg gegeben worden. Es könnte sein, daß diese Dosis auch bei den Herzinsuffizienzen wirksam gewesen wäre. Außerdem drängt sich aber der Eindruck auf, daß die Tubuluszellen im Zustand der Herzinsuffizienz der rückresorptionsmindernden Wirkung der Herzglykoside schwerer zugänglich sind als normalerweise.

Auch innerhalb der Digitoxingruppe reagierten ja keineswegs alle Patienten mit einer Steigerung der Wasser- und Elektrolytausscheidung. Dagegen zeigten in den früher berichteten Untersuchungen mit Digitoxin am Herzgesunden alle Vpn. eine vermehrte Elektrolytausscheidung. Im Zustand der Herzinsuffizienz scheinen sich die Digitalisglykoside gegenüber vermehrt vorhandenen rückresorptionsfördernden Substanzen nur bei höheren Dosen und auch dann nicht generell durchsetzen zu können. Es besteht die Möglichkeit, daß es sich bei diesen rückresorptionsfördernden Substanzen um Nebennierenrindenhormone handelt. So wurde in letzter Zeit eine *vermehrte Ausscheidung von Aldosteron* im Harn von herzinsuffizienten Patienten beschrieben (Axelrad u. Mitarb.; Liddle u. Mitarb.). Bei der engen chemischen Verwandtschaft mit den Digitalisglykosiden könnte man sich einen kompetitiven Wirkungsmechanismus vorstellen. Doch sind diese Verhältnisse noch zu wenig geklärt, um klare Aussagen machen zu können.

Es ist die *weitere Frage* zu diskutieren, *ob sich die verminderte Rückresorption auf Natrium und Chlorid in gleicher Weise erstreckt* oder ob eines der beiden Ionen bevorzugt beeinflußt wird. Die Betrachtung der

Tabelle 12. *Natriumausscheidung/Chloridausscheidung im 24 Stundenharn bei Herzgesunden und Herzinsuffizienten ohne und mit Digitoxin.* n = Anzahl der 24 Stunden-Perioden

	Herzgesunde				Herzinsuffiziente					
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	Mittelwerte	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	Mittelwerte
ohne Digitoxin	$n = 25$ 0,90	$n = 25$ 0,82	$n = 25$ 0,87	$n = 75$ 0,86	$n = 18$ 1,65	$n = 18$ 1,46	$n = 14$ 1,20			$n = 50$ 1,46
mit Digitoxin	$n = 9$ 0,94	$n = 9$ 0,83	$n = 9$ 0,81	$n = 27$ 0,86	$n = 18$ 1,07	$n = 18$ 1,05	$n = 17$ 1,09	$n = 17$ 1,00	$n = 9$ 1,10	$n = 79$ 1,06

Na/Cl-Quotienten vor und nach Digitalisgabe kann hierüber Auskunft geben. In den Tab. 12 und 13 sind die Mittelwerte der Na/Cl-Quotienten bei Herzgesunden und Herzinsuffizienten wiedergegeben. Die Quotienten bei Herzgesunden wurden für die kurzfristigen Versuche aus den Zahlenwerten der Arbeit von Dörrie, Göltner u. Schwab, für die 24 stündigen Harnsammelperioden aus den Werten bei Göltner u. Schwab berechnet. Es fällt zunächst auf, daß beim Herzgesunden der Na/Cl-Quotient stets unter 1 liegt, also mehr Chlorid als Natrium im Harn ausgeschieden wird. Dieses Verhalten wurde sowohl bei den kurzdauernden Sammelperioden als auch bei den 24 Stunden-Perioden beobachtet.

Entsprechende Na/Cl-Quotienten lassen sich aus den bei Farber u. Mitarb. wiedergegebenen Zahlenwerten berechnen. Nur Mainzer fand bei 50 Tag- und 50 Nachturinen, die von 13 Vpn. stammten, das Mittel bei 1,0.

Bei Herzgesunden ändern nun Strophanthin und Digitoxin die Na/Cl-Quotienten praktisch nicht. Man darf hieraus den Schluß ziehen, daß die *Rückresorptionsminderung in gleicher Weise für Natrium wie für Chlorid* erfolgt. Bei den herzinsuffizienten Patienten liegt der Na/Cl-Quotient interessanterweise sowohl bei der Digitoxin- als auch bei der Strophanthingruppe über 1. Es wird also verhältnismäßig mehr Natrium als Chlorid ausgeschieden. Bei der Digitoxingruppe fällt der Quotient während der ersten 3 Tage, also vor der Digitoxinverabreichung, deutlich ab. Während der Digitoxinbehandlung liegt er zwar eindeutig niedriger als zuvor, es ist aber schwer zu entscheiden, ob sich der Abfall während der Vorbeobachtungstage nicht ohne Digitoxin fortgesetzt und auf einem niedrigen Wert stabilisiert hätte. Ein Beweis dafür, daß die beiden Glykoside die Ausscheidung eines Ions mehr als die des anderen fördern, lassen sich also nicht gewinnen.

Einen besonderen Hinweis verdient die Tatsache, daß die Wasser-, Natrium- und Chloridausscheidung bei der Digitoxingruppe zwar im Mittel, aber keineswegs bei allen Vpn. gesteigert ist. Im Unterschied dazu ist die Kaliumausscheidung in allen Fällen erhöht. Es liegt der Schluß nahe, daß der *Mechanismus der Ausscheidungsbeeinflussung von Natrium und Chlorid einerseits und Kalium andererseits durch Digitoxin verschieden* ist.

Es läßt sich bisher noch nicht übersehen, ob die *Minderung der Rückresorption in den proximalen oder distalen Tubulusabschnitten* stattfindet. Es liegt nahe, zur Entscheidung dieser Frage andere in diesen Abschnitten lokalisierte Leistungen zu untersuchen. Für den proximalen Tubulusabschnitt kommen dabei die maximale tubuläre Ausscheidung von Para-Aminohippursäure (T_m PAH) und die maximale Rückresorption von Glucose (T_m Glucose), für den distalen Abschnitt Titrationsacidität und p_H des Harns in Frage. In noch nicht veröffentlichten Untersuchungen wurden keine Veränderungen der Titrationsacidität bei Herzgesunden und Herzinsuffizienten unter Digitoxin gefunden. Weitere diesbezügliche Untersuchungen sind für die Lokalisation des Ortes der Rückresorptionsminderung erforderlich.

Die *Plasmaelektrolyte Natrium, Kalium und Chlorid* liegen bei der Digitoxingruppe im Bereich der Norm und zeigen während der 3 Vorbeobachtungstage nur unwesentliche Schwankungen. *Unter Digitoxinverabreichung* tritt ein *signifikanter Abfall von* $[Na^+]$ *und ein* ebenfalls statistisch gesicherter *Anstieg von* $[K^+]$ ein. $[Cl^-]$ zeigt erst gegen Ende der Digitoxinverabreichung eine signifikante Verminderung.

In der Strophanthingruppe lag $[Na^+]$ mit 146,5 $\pm$ 1,64 mval/l signifikant über den Normalwerten. $[K^+]$ und $[Cl^-]$ zeigten keine Unterschiede gegenüber der Norm. *Nach Strophanthin* traten *keine signifikanten Veränderungen der Elektrolyte* auf. Es ist aber möglich, daß bei einer Vergrößerung der Zahl der untersuchten Personen ein signifikanter

Tabelle 13. *Natriumausscheidung/Chloridausscheidung im Harn bei Herzgesunden und Herzinsuffizienten vor und nach Strophanthin*
n = Anzahl der Ausscheidungsperioden

	Herzgesunde						Herzinsuffiziente				
	1. Periode	2. Periode	3. Periode	4. Periode	5. Periode	Mittelwerte	1. Periode	2. Periode	3. Periode	4. Periode	Mittelwerte
vor Strophanthin	$n = 23$ 0,90	$n = 23$ 0,96	$n = 23$ 0,91	$n = 8$ 0,88	$n = 8$ 0,87	$n = 85$ 0,91	$n = 8$ 1,08	$n = 8$ 1,03	$n = 7$ 0,98		$n = 23$ 1,03
nach Strophanthin	$n = 15$ 0,86	$n = 15$ 0,90	$n = 15$ 0,89	$n = 6$ 0,80	$n = 6$ 0,83	$n = 57$ 0,87	$n = 8$ 0,99	$n = 8$ 0,97	$n = 8$ 0,96	$n = 7$ 0,97	$n = 31$ 0,97

Tabelle 14. *Übersicht über die von verschiedenen Autoren gefundenen Plasma-*

Autoren	Methode	Normalwerte		
		Na	K	Cl
Crutchfield u. Wood (1948)	Gravimetrisch n. Butler u. Tuthill	$n = 7$ 142,2 ± 0,922		
Mokotoff, Ross u. Leiter (1948)	Gravimetrisch n. Butler u. Tuthill	$n = 13$ (9♂, 4♀) 134,2 ± 1,496		
Dochios u. Dreifus (1951)		137—142	4,5—5,6	95—105
Miller (1951)	Flammenphotometrisch	$n = 54$ 139,5		
Squires, Singer, Moffitt u. Elkinton (1951)	Na, K } Flammenphotometrisch Cl n. Eisenman	$n = 22$ 139,2 ± 0,532	$n = 21$ 4,00 ± 0,072	$n = 17$ 100,9 ± 0,388
Iseri, McCaughey, Alexander u. Mitarb. (1952)	Na, K } Flammenphotometrisch	$n = 73$ 142,0 ± 0,363	$n = 73$ 4,06 ± 0,035	
Göltner, Koch u. Schwab (1955)	Na, K } Flammenphotometrisch Cl merkurimetrisch n. O. u. S. Schales	$n = 61$ 142,7 ± 0,533	$n = 61$ 4,22 ± 0,049	$n = 50$ 106,8 ± 0,398

Abfall von [Na^+] eingetreten wäre. Dieses gegenüber der Digitoxingruppe und den Strophanthinuntersuchungen am Herzgesunden unterschiedliche Verhalten des Plasmanatriums kann zum Teil an der niedrigen Dosis liegen. Die früher mitgeteilten Befunde am Herzgesunden wurden mit 0,35 mg Strophanthin gewonnen. Außerdem mag aber auch hier ein schwereres Ansprechen bei Herzinsuffizienz von Bedeutung sein.

Es erhebt sich die *Frage, ob die Abnahme von* [Na^+] *und die Zunahme von* [K^+] *in der Digitoxingruppe auf eine unmittelbare Wirkung des Glykosids oder auf andere Ursachen, z. B. die Beschränkung der Kochsalzzufuhr, zurückzuführen sind.* Die klinisch üblicherweise verabreichte kochsalzbeschränkte Kost enthält etwa noch 1,5—2,5 g Natrium täglich. Es ist nicht bekannt, daß darunter bei Herzgesunden und Herzinsuffizienten

konzentrationen (mval/l) von Natrium, Kalium und Chlorid bei Herzinsuffizienz

Werte bei Herzinsuffizienz			Vorbehandlung
Na	K	Cl	
$n = 14$ $135{,}0 \pm 0{,}872$ $P < 0{,}01$			Keine Angaben
$n = 16$ (7♂, 9♀) $135{,}2 \pm 1{,}392$ $P > 0{,}05$			Digitalisglykoside in unbekannter Dosierung; in einzelnen Fällen Quecksilberdiuretica; salzbeschränkte Kost
$140{,}5 \pm 1{,}613$	$5{,}00 \pm 0{,}205$	$90{,}6 \pm 2{,}464$	Keine Angaben
$n = 26$ 135,2			In der Mehrzahl der Fälle Digitalisglykoside u. Quecksilberdiuretica in unbekannter Dosierung
$n = 30$ $134{,}7 \pm 1{,}310$ $P < 0{,}01$	$n = 28$ $4{,}17 \pm 0{,}089$ $P > 0{,}05$	$n = 27$ $92{,}5 \pm 1{,}385$ $P < 0{,}01$	In der Mehrzahl der Fälle Quecksilberdiuretica. Ausschluß von Patienten mit renalen Komplikationen u. Erbrechen
$n = 71$ $149{,}0 \pm 0{,}855$	$n = 71$ $4{,}80 \pm 0{,}083$		Keine Angaben. Ausschluß von Patienten mit renalen Komplikationen, Erbrechen oder Durchfällen
$n = 18$ $142{,}7 \pm 0{,}993$ $P > 0{,}05$	$n = 18$ $4{,}08 \pm 0{,}099$ $P > 0{,}05$	$n = 18$ $105{,}7 \pm 1{,}192$ $P > 0{,}05$	Keine oder völlig ungenügende Vorbehandlung mit Digitalisglykosiden
$n = 11$ $146{,}5 \pm 1{,}640$ $P = 0{,}01$	$n = 11$ $4{,}08 \pm 0{,}165$ $P > 0{,}05$	$n = 11$ $108{,}8 \pm 1{,}406$ $P = 0{,}065$	

im Zeitraum von etwa 8 Tagen eine Verminderung des Plasmanatriums eintritt. Für eine ursächliche Bedeutung des Digitoxins sprechen vor allem die gleichsinnigen Veränderungen am Herzgesunden. Diese waren allerdings schon am ersten Tag der Digitoxingabe mit einem Abfall des $[Na^+]$ von $145{,}0 \pm 1{,}03$ auf $140{,}9 \pm 1{,}88$ mval/l deutlich ausgeprägt. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß bei diesen Untersuchungen am Herzgesunden bereits am ersten Tag 0,8 mg Digitoxin gegenüber 0,6 mg in den hier vorliegenden Untersuchungen gegeben wurden. Trotz dieser unterschiedlichen Dosierung besteht der Eindruck, daß die Verminderung von $[Na^+]$ bei den Herzinsuffizienten langsamer in Gang kommt als bei Herzgesunden. Dagegen war der Kaliumanstieg bei letzteren ausgeprägter als bei den normalen Vpn.

In diesem Zusammenhang ist auf die bei Herzinsuffizienz mehrfach berichtete *Hyponatriämie* einzugehen. In Tab. 14 sind einige von verschiedenen Autoren in den letzten Jahren zu diesem Problem mitgeteilte Befunde zusammengestellt. [K^+] und [Cl^-] wurden der Vollständigkeit halber mit in die Tabelle aufgenommen. Außer bei den Angaben von Squires u. Mitarb. wurden, wo es die mitgeteilten Daten erlaubten, die mittleren Fehler berechnet und die statistische Auswertung mit dem t-Test vorgenommen. Trotz der manchmal recht lückenhaften Angaben über die vorausgehende Behandlung ist aus der Tabelle zu ersehen, daß [Na^+] da normal oder sogar mäßig erhöht gefunden wurde, wo keine oder eine unzureichende Herzbehandlung vorausging und keine Quecksilberdiuretica gegeben wurden. Squires u. Mitarb. möchten die Behandlung mit Quecksilberdiuretica für die verminderte Natrium- und Chloridkonzentration verantwortlich machen. Nun führen Quecksilberdiuretica allein vorwiegend zu einer Verminderung von [Cl^-], erst bei häufiger Anwendung und relativ spät auch zu einer Erniedrigung von [Na^+]. Werden sie dagegen mit Ammoniumchlorid kombiniert, wie es ja zur Verstärkung der Quecksilberdiurese häufig geschieht, dann entsteht früher und ausgeprägter eine Verminderung von [Na^+]. Außerdem führt aber, wie die vorstehend mitgeteilten Befunde zeigen, auch eine hochdosierte Digitalistherapie zu einer Abnahme von [Na^+]. Die *Hyponatriämie ist damit Behandlungsfolge, nicht eine der Herzinsuffizienz selbst zugehörende Veränderung.* Man kann deshalb Miller auch nicht beipflichten, wenn er die Hyponatriämie als Beweis für die primäre Retention von Wasser bei der kardialen Ödembildung anführt.

Die bei den 11 Patienten der Strophanthingruppe gefundene [Na^+] von 146,7 $\pm$ 1,64 mval/l ist gegenüber dem Normalwert von 142,7 $\pm$ 0,533 mval/l sogar signifikant höher. Auch bei einer Gruppierung des gesamten Materials nach Schweregraden bzw. Grad der Ödemausprägung ließ sich in den leichteren Fällen eine im oberen Bereich der Norm gelegene [Na^+] feststellen. Allerdings konnten die Unterschiede zwischen diesen Gruppen statistisch nicht gesichert werden. Auf ihre Wiedergabe wird deshalb verzichtet. Es fällt jedenfalls auf, daß die Werte für *Plasmanatrium bei unbehandelten Fällen von Herzinsuffizienz häufiger im oberen Bereich der Norm oder sogar höher liegen als normalerweise.* Ähnliche Beobachtungen machten Iseri u. Mitarb. (Tab. 14).

Wenn auch [K^+] im Plasma im Bereich der Norm liegt, so darf daraus noch nicht ohne weiteres auf einen normalen Kaliumgehalt der Zellen bei Herzinsuffizienz geschlossen werden. So wurden bei unmittelbarer Untersuchung von *Herz- und Skelettmuskel im Zustand der Herzinsuffizienz Verminderungen des Kaliumgehalts* gefunden.

Mokotoff, Ross und Leiter gaben zwar in diesem Zusammenhang zu bedenken, daß bei Verwendung des Chloridraums als Grundlage für die Bestimmung der extracellulären Flüssigkeit und damit des intracellulären Kaliums Fehlermöglichkeiten entstehen. Doch sind die mitgeteilten Kaliumverminderungen zu groß, als daß sie durch die Einwände von Mokotoff, Ross und Leiter rein methodisch erklärt werden könnten. So fanden Iseri u. Mitarb. an excidierten Proben aus dem Deltamuskel bei herzinsuffizienten Patienten eine Verminderung des Kaliumgehaltes um 30,1% gegenüber dem Zustand der wiederhergestellten Kompensation. Auch Clarke und Mosher berichteten von einer deutlichen Erniedrigung des

Kaliumgehaltes im Herzmuskel von Patienten, die an Herzinsuffizienz verstorben waren. Schließlich zeigen Bilanzversuche, die während der Erholungsphase angestellt wurden, ein Kaliumdefizit in den Zellen im Zustand der Herzinsuffizienz (NEWMAN; ISERI, BOYLE und MYERS; MILLER; SQUIRES, CROSLEY und ELKINTON).

Es erhebt sich nun die *Frage, wie die Verminderung von* $[Na^+]$ *und der Anstieg von* $[K^+]$ *im Plasma zu erklären ist.* Der Abfall von $[Na^+]$ kann nur so zustandekommen, daß mehr Natrium als Wasser aus dem extracellulären Raum entfernt wird. Auffälligerweise stieg nun, wie die Tab. 15 zeigt, $[Na^+]$ im Urin nur während der ersten beiden Tage der Digitoxinverabreichung an. Später fiel die Natriumkonzentration sogar unter den Ausgangswert ab. Im Mittel wurde also mehr Wasser als Natrium im Vergleich zu den Vorbeobachtungstagen durch die Niere ausgeschieden. Die Natriumausscheidung durch den Stuhl und die nichtschwitzende Haut kann als praktisch bedeutungslos vernachlässigt werden (GORHAM, LESTER u. Mitarb.; FREYBERG u. GRANT). Wenn auch die Natriumzufuhr während der Untersuchungstage nicht gemessen wurde, so ist die *Verminderung von* $[Na^+]$ *doch am wahrscheinlichsten mit einem Abwandern von Natrium in den intracellulären Raum* zu erklären. Es ist aus den hier vorgelegten Untersuchungen nicht zu ersehen, ob die intracelluläre Natriumaufnahme auch später noch bestehen bleibt.

Interessanterweise fanden auch ISERI, BOYLE und MYERS bei 6 von insgesamt 7 untersuchten Patienten eine intracelluläre Aufnahme von Natrium. Diese Untersuchungen wurden mit der Bilanzmethodik über 6 bis 16 Tage durchgeführt. Dabei erhielten die Patienten eine sehr natriumarme Kost

Tabelle 15. *Natrium- und Chloridkonzentrationen (mval/l) im 24 Stunden-Harn bei Herzgesunden und Herzinsuffizienten ohne und mit Digitoxin.* n = Anzahl der 24 Stunden-Perioden

	Herzgesunde		Herzinsuffiziente													
	Mittelwerte		1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag		Mittelwerte			
	Na	Cl	Na	Cl	Na	Cl	Na	Cl	Na	Cl	Na	Cl	Na	Cl		
ohne Digitoxin	$n = 75$		$n = 18$		$n = 18$		$n = 14$						$n = 50$			
	128,3	144,4	136,8	108,5	132,3	113,6	121,6	107,9					130,9	110,2		
mit Digitoxin	$n = 27$		$n = 18$		$n = 18$		$n = 17$		$n = 17$		$n = 10$	$n = 9$	$n = 80$		$n = 79$	
	148,9	173,4	136,1	132,5	133,0	130,6	125,9	125,1	116,7	118,1	112,6	97,1	126,2		123,3	

(50 mg/Tag) und Digitalis-Erhaltungsdosen. Quecksilberdiuretica wurden nur vereinzelt gegeben. Im Gegensatz dazu stehen die Bilanzversuche von Squires, Crosley und Elkinton, die in 6 Untersuchungen an 5 herzinsuffizienten Patienten mit einer Ausnahme stets eine Verminderung des intracellulären Natriums sahen. Möglicherweise liegt die Erklärung für diese gegensätzlichen Befunde darin, daß Squires u. Mitarb. während ihrer Bilanzversuche reichlich Quecksilberdiuretica gaben. Die ebenfalls mit der Bilanzmethodik durchgeführten Untersuchungen von Newman und Miller können hier deswegen nicht herangezogen werden, weil diese Autoren keine Trennung in extracelluläre und intracelluläre Veränderungen vorgenommen haben.

Der *Anstieg von* $[K^+]$ *im Plasma* ist bei der gleichbleibenden Kaliumkonzentration im Harn (Tab. 16) und der unter den vorliegenden Bedingungen vernachlässigbaren extracellulären Kaliumausscheidung nur mit einem *Kaliumaustritt aus den Zellen* zu erklären.

Tabelle 16. *Kaliumkonzentrationen (mval/l) im 24 Stunden-Harn bei Herzinsuffizienz ohne und mit Digitoxin.* n = Anzahl der 24 Stunden-Perioden

	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	Mittelwerte
ohne Digitoxin	$n = 18$ 63,3	$n = 18$ 68,0	$n = 14$ 71,3			$n = 50$ 67,3
mit Digitoxin	$n = 18$ 68,8	$n = 18$ 66,8	$n = 17$ 66,1	$n = 17$ 70,0	$n = 10$ 64,15	$n = 80$ 67,5

Es interessieren in diesem Zusammenhang Untersuchungen des Kaliumgehaltes verschiedener Gewebe unter Digitalisglykosiden. Am Herzmuskel sahen Calhoun und Harrison nach toxischen Digitalisdosen eine deutliche Verminderung des Kaliumgehaltes, während therapeutische Dosen keinen Unterschied erkennen ließen. Wood und Moe berichteten in Untersuchungen am Herz-Lungen-Präparat des Hundes ebenfalls von einer Verminderung des Kaliumgehaltes. Wedd kam auf Grund von Untersuchungen an Katzen- und Schildkrötenherzen zu der Überzeugung, daß Kaliumverluste nur nach toxisch wirkenden Dosen zu beobachten sind. Hagen beobachtete am isolierten Kaninchenherzen einen Kaliumanstieg nach therapeutischen, eine Verminderung nach toxischen Dosen. Auch Boyer und Poyndexter sahen am Katzenherzen, Clarke und Mosher am menschlichen Herzen nach therapeutischen Digitalisdosen einen Anstieg des Kaliumgehaltes. Man gewinnt also den Eindruck, daß es ganz entscheidend *von der Dosierung abhängt, ob eine Kaliumzunahme oder Abnahme* auftritt. Am Skeletmuskel (Froschsartorius) sahen Cattel und Goodel eine Abnahme. Bei den Bilanzversuchen von Newman, Miller, Iseri u. Mitarb. und Squires u. Mitarb. wurden während der Erholung von der Herzinsuffizienz positive Kaliumbilanzen, also intracelluläre Kaliumretention, gefunden. Dabei wurde mehr Kalium retiniert, als durch den intracellulären Stickstoffansatz erklärt werden konnte. Diese zunächst gegensätzlich erscheinenden Beobachtungen lassen sich auf folgende Weise mit den hier mitgeteilten Befunden in Einklang bringen. Während der ersten Tage der Behandlung ist unter dem Einfluß hochdosierter Digitalistherapie und der in diesen Tagen oft unzureichenden Nahrungsaufnahme ein Austritt von Kalium aus den Zellen zu erwarten. Später kommt es dann mit Besserung des klinischen Zustandes, Herabsetzung der Digitalisgaben auf Erhaltungsdosis und vermehrter Nahrungsaufnahme,

besonders wenn die Kost reichlich Eiweiß und Kalium enthält, zu einer positiven Kaliumbilanz.

Was nun den *Mechanismus der kardialen Ödembildung* betrifft, so ist zweifellos die Vermehrung der extracellulären Flüssigkeit der auffälligste Befund. Dabei ist die extracelluläre Natriumkonzentration normal oder sogar leicht erhöht. Dieser Befund würde bei Bestätigung an einer größeren Zahl unbehandelter Fälle die Anschauung stützen, daß bei der Vermehrung der extracellulären Flüssigkeit die Verminderung der Natriumausscheidung als primärer Vorgang, die Wasserretention als deren Folge anzusehen sind. Daneben ist aber auch das intracelluläre Flüssigkeitsvolumen vermehrt. Dieses geht aus folgenden Beobachtungen hervor. Wäre das kardiale Ödem lediglich durch eine Anhäufung extracellulärer Flüssigkeit gekennzeichnet, dann müßte bei der Ödemausschwemmung einem Flüssigkeitsverlust von 1 Liter ein Natriumverlust von rund 145 mval entsprechen. Die Bilanzversuche von Iseri u. Mitarb., Squires u. Mitarb. und Miller zeigen aber, daß sehr viel mehr Wasser ausgeschieden wird, als nach dieser Relation zu erwarten wäre. Hieraus muß man auf eine zusätzliche Wasserausscheidung aus dem intracellulären Raum schließen. Die bzw. bestimmte Körperzellen müssen also im Zustand des kardialen Ödems wasserreicher als normalerweise sein. Dabei besteht noch Uneinigkeit darüber, ob der intracelluläre Natriumgehalt ebenfalls vermehrt (Squires u. Mitarb.) oder ob er vermindert ist (Iseri u. Mitarb.). Der Kaliumgehalt der Zellen ist nach dem oben Gesagten sicher vermindert.

Die extracelluläre Flüssigkeitsvermehrung wird man voraussichtlich mit einer primären Retention von Natrium, der die Wasserretention sekundär folgt, ausreichend erklären können. In weiteren Untersuchungen wird zu klären sein, ob Aldosteron tatsächlich der für die vermehrte Natriumrückresorption verantwortliche Stoff ist, und welcher Mechanismus seiner vermehrten Freisetzung zugrunde liegt.

Als Ursache der intracellulären Flüssigkeitsanreicherung nehmen Squires und Mitarb. sowie Iseri und Mitarb. ein Steigerung der osmotischen Aktivität vorher osmotisch unwirksamer Zellbestandteile an. Ob hierfür der Anoxie oder dem Stress (Iseri u. Mitarb.) mit den daraus folgenden hormonalen Reaktionen eine wesentliche Bedeutung zukommt, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen.

Zusammenfassung

1. Digitoxin bewirkte einen deutlichen Anstieg der Wasser-, Natrium-, Chlorid- und Kaliumausscheidung, während das Glomerulusfiltrat unverändert blieb. Die vermehrte Wasser- und Elektrolytausscheidung muß demnach durch eine Verminderung der Rückresorption zustande kommen. Diese Rückresorptionsminderung wird auf einen unmittelbaren Angriff des Digitoxins an den Tubuluszellen zurückgeführt.

2. Strophanthin bewirkte bei einmaliger Gabe von 0,25 mg keine signifikanten Veränderungen des Glomerulusfiltrats und der Wasser- und Elektrolytausscheidung.

3. Die Natriumkonzentration im Plasma fiel unter Digitoxin signifikant ab, während die Kaliumkonzentration anstieg. Die Chloridkonzentration war lediglich am 4. Tage der Digitoxinverabreichung signifikant erniedrigt. Die Verminderung des Plasmanatriums muß neben der anfangs vermehrten Ausscheidung im Harn auf eine Abwanderung von Natrium in die Zellen bezogen werden. Der Anstieg

des Plasmakaliums trotz vermehrter Ausscheidung im Harn spricht dagegen für einen Austritt von Kalium aus den Zellen.

4. Strophanthin bewirkte bei einmaliger Gabe von 0,25 mg keine signifikanten Änderungen der Plasmaelektrolyte.

Literatur

Asper, S. P., O. and S. Schales: J. of Biol. Chem. **168**, 779 (1947). — Axelrad, B. J., J. E. Cates, B. B. Johnson and J. A. Luetscher: Brit. Med. J. **1955 1**, 196. — Boyer, P. K., and Ch. A. Poindexter: Amer. Heart J. **20**, 586 (1940). — Briggs, A. P., D. M. Fowell, W. F. Hamilton and Mitarb.: J. Clin. Invest. **27**, 810 (1948). — Calhoun, I. A., and T. R. Harrison: J. Clin. Invest. **10**, 139 (1931). — Cattel, Mc K., and H. Goodell: Science (Lancaster, Pa.) **86**, 106 (1937). — Clarke, N. E., and R. E. Mosher: Circulation (New York) **5**, 907 (1952). — Crutchfield, A. J., and J. E. Wood: Ann. Int. Med. **28**, 28 (1948). — Davies, C. E., and J. A. Kilpatrick: Clin. Sci. **10**, 53 (1951). — Davis, I. O., and N. W. Shock: J. Clin. Invest. **28**, 1459 (1949). — Dochios, M., and L. S. Dreifus: Amer. J. Med. Sci. **222**, 538 (1951). — Dörrie, H., E. Göltner u. M. Schwab: Klin. Wschr. **1954**, 165. — Eichna, L. W., S. I. Farber, A. R. Berger and Mitarb.: J. Clin. Invest. **30**, 1250 (1951). — Eichna, L. W., S. J. Farber, A. R. Berger and Mitarb.: Circulation (New York) **7**, 674 (1953). — Farber, S. I., I. D. Alexander, E. D. Pellegrino and D. P. Earle: Circulation (New York) **4**, 378 (1951). — Freyberg, R. H., and R. L. Grant: J. Clin. Invest. **16**, 729 (1937). — Göltner, E., u. M. Schwab: Klin. Wschr. **1954**, 542. — Gorham, L. W., D. E. Lester, A. V. Wolf and H. H. Shultz: Ann. Int. Med. **27**, 575 (1947). — Gremels, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **157**, 92 (1930). — Hagen, P. S.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **67**, 50 (1939). — Heller, B. I., and W. E. Jacobson: Amer. Heart J. **39**, 188 (1950). — Iseri, L. T., R. S. McCaughey, L. Alexander u. Mitarb.: Am. J. Med. Sci. **224**, 135—145 (1952). — Iseri, L. T., A. J. Boyle and G. B. Myers: Amer. Heart J. **40**, 706 (1950). — Iseri, L. T., A. J. Boyle, D. E. Chandler and G. B. Myers: Circulation (New York) **11**, 615 (1955). — Liddle, G. W., F. C. Baitter, L. E. Duncan and Mitarb.: J. Clin. Invest. **34**, 949 (1955). — Mainzer, F.: Amer. J. Med. Sci. **199**, 232 (1940). — Merrill, A. J.: Amer. J. Med. **6**, 357 (1949). Miller, G. E.: Circulation (New York) **4**, 270 (1951). — Mokotoff, R., G. Ross and L. Leiter: J. Clin. Invest. **27**, 1 (1948); **31**, 291 (1952). — Newman, E. V.: Amer. J. Med. **7**, 490 (1949). — Schwab, M.: Klin. Wschr. **1953**, 1030. — Seymour, W. B., W. H. Pritchard, L. P. Longley and M. Hayman: J. Clin. Invest. **21**, 229 (1942). — Sinclair-Smith, B., A. A. Kattus, J. Genest and E. V. Newman: Bull. Johns Hopkins Hosp. **84**, 369 (1949). — Squires, R. D., R. B. Singer, G. R. Moffitt and I. R. Elkinton: Circulation (New York) **4**, 697 (1951). — Squires, R. D., A. P. Crosley and I. R. Elkinton: Circulation (New York) **4**, 868 (1951). — Stockton, A. B.: Arch. Int. Med. **50**, 480 (1932). — Wedd, A. M.: J. Pharmacol. a. Exper. Med. **65**, 268 (1939). — Wood, E. H., and G. K. Moe: Amer. J. Physiol. **123**, 219 (1938).

Privatdozent Dr. Max Schwab, Göttingen, Medizinische Universitätsklinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 271—287 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)

Elektrolytverschiebungen in der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur durch Acetylcholin bei Durchströmung mit natriumchloridarmer Blut-Tyrode-Lösung

Von
Otto Kraupp

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. November 1955)

Die Energieamplitude der fortgeleiteten Erregung in Nerv- und Muskelfasern wird mittels Ionenverschiebungen durch die Grenzflächenmembranen über die gesamte Leitungsstrecke dekrementlos aufrechterhalten. Hierbei findet am jeweiligen Orte der Erregung senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung primär ein Eintritt von Natriumionen und zeitlich etwas später ein Austritt von Kaliumionen durch die Membranen statt[12]. Demgegenüber herrscht über die Natur der durch Acetylcholin (ACh) an der Endplattenmembran hervorgerufenen Ionenverschiebungen noch keine endgültige Klarheit. Einer Erklärung der Depolarisationswirkung des ACh durch eine in gleicher Weise wie an der Nerv- und Muskelmembran erfolgende starke Erhöhung der Natrium- gegenüber der Kaliumpermeabilität in der Anstiegsphase der Erregung steht die Tatsache entgegen, daß nie eine durch Hervortreten eines Natriumpotentials bedingte Umkehr des Endplattenpotentials beobachtet wurde[2, 8, 9, 18]. Auf Grund dieses Verhaltens wurden folgende theoretische Vorstellungen für die dem Endplattenpotential zugrunde liegenden Ionenverschiebungen aufgestellt: 1. Die Annahme einer für alle Ionen in gleicher Weise erfolgenden Permeabilitätserhöhung durch ACh und dadurch bedingt Absinken des Potentials der Endplatte auf den Wert des Diffusionspotentials zwischen Myoplasma und Extracellulärflüssigkeit. (Kurzschlußtheorie von Fatt und Katz[8, 2]) und 2. die Annahme einer durch ACh hervorgerufenen rasch einsetzenden Permeabilitätssteigerung der Endplattenmembran für Natriumionen, die jedoch mit fortschreitender Depolarisation immer geringer wird, so daß kein Umschlag des Endplattenpotentials eintritt (Nastuk[18]).

In einer vorangegangenen Mitteilung wurde gezeigt[14], daß die nach intraarteriellen ACh-Injektionen an der innervierten und denervierten

Extremität auftretende Freisetzung von Kaliumionen mit Hilfe aus der „Kurzschlußtheorie" abzuleitender Gleichungen quantitativ befriedigend erklärt werden konnte. In der vorliegenen Arbeit wird nun versucht, einen Einblick in die Rolle und Bedeutung der Natrium- und Chlorionen für die durch ACh hervorgerufene Endplattendepolarisation zu gewinnen. In analoger Weise wie bei den elektrophysiologischen Untersuchungen gleicher Zielsetzung[3, 7, 18, 19] wird zunächst der Einfluß einer Herabsetzung der Natriumchloridkonzentration in der Extracellulärflüssigkeit auf den Verlauf der Endplattendepolarisation bzw. der dadurch hervorgerufenen Kaliumfreisetzung nach intraarteriellen Injektionen von ACh an hinteren Extremitäten von Katzen studiert. Durch die Herabsetzung der Natrium- und Chlorionenkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit war es außerdem möglich, die nach ACh auftretenden Veränderungen der arteriovenösen Konzentrationsdifferenzen auch für diese Ionen mitzubestimmen. Die Versuche wurden wieder gleichzeitig an normal innervierten und chronisch denervierten Extremitäten durchgeführt.

Methodik

Die Versuche wurden an Katzen im Gewicht von 2,3—2,8 kg durchgeführt. Die Durchströmung der hinteren Extremitäten erfolgte in derselben Anordnung wie in [14], wobei wieder besonderer Wert auf die Temperaturkonstanz des Wasserbades (36 ± 0,2° C) gelegt wurde. Die Durchströmung wurde zunächst mit einer Blut-Tyrode-Verdünnung begonnen. (1 Teil Blut einer Spenderkatze mit 5 Teilen Tyrodelösung der folgenden Zusammensetzung: Na: 149 mM/l, K: 3,8 mM/l, Ca: 1,8 mM/l, Mg: 0,26 mM/l, Cl: 144 mM/l, HCO_3: 10,4 mM/l, H_2PO_4: 0,4 mM/l, Glucose: 8,3 mM/l. Die Lösung stand ständig mit 95% O_2 und 5% CO_2 bei Atmosphärendruck im Gleichgewicht). Nach 5 min wurde mittels eines Zweiweghahnes auf eine natriumchloridarme Durchströmungsflüssigkeit umgeschaltet (1 Teil Blut einer Spenderkatze mit 5 Teilen einer Lösung folgender Zusammensetzung: K: 8,3 mM/l, Ca: 1,8 mM/l, Mg: 0,26 mM/l, Cl: 7,9 mM/l, Glucose: 8,3 mM/l, Sacharose: 250 mM/l). Für jeden Versuch wurden 3 Liter dieser Durchströmungsflüssigkeit zubereitet und die Durchströmung in der Regel 90—100 min lang ausgeführt. 30 min nach der Umschaltung wurde mit den intraarteriellen ACh-Injektionen begonnen. (Bei allen Dosen ein konstantes Injektionsvolumen von 1 ml/sec.) In den Versuchen mit d-Tubocurarin (dTC) wurde dieses vor Beginn des Versuches beiden Durchströmungsflüssigkeiten in einer Konzentration von 10^{-5} M/l zugesetzt. Mit Ausnahme der Versuche KK 31 und KK 36 war an jedem Tier eine Extremität 8—14 Tage vor dem Durchströmungsversuch durch Durchschneidung der Nn ischiadicus und femoralis denerviert worden. In Versuch KK 36 wurde eine der beiden Extremitäten vor Durchströmungsbeginn unter Abbindung aller Hautgefäße enthäutet. Da sich die in die Aorta injizierten ACh-Gesamtdosen im Verhältnis der Durchflußgeschwindigkeiten auf die beiden Extremitäten aufteilen, wurden die in den Versuchsergebnissen angegebenen ACh-Dosen für jede Extremität aus der Gesamtdosis und dem Durchflußverhältnis errechnet. Das in das Tier eintretende Blut wurde am Anfang und am Ende des Versuches, das aus den beiden Extremitäten austretende Blut getrennt in Sammelperioden zu je 2 min aufgefangen, zentrifugiert und auf seinen Gehalt an Kalium-, Natrium- und Chlorionen analysiert. Für die Kalium- und Natriumbestimmungen wurde von jeder Sammelperiode ein aliquoter Teil verascht

(1 ml Probe + 2 ml konz. H_2SO_4 und nach Verkohlung Zusatz von 1 ml konz. HNO_3 — anschließend Sieden im Veraschungskölbchen bis zur völligen Klarheit) und der Kaliumgehalt nach Verdünnung 1 : 10 sowie der Natriumgehalt nach Verdünnung 1 : 20 (bezogen auf die zur Veraschung gebrachte Probenmenge) flammenphotometrisch bestimmt. (Flammenphotometer: Firma Lange, Berlin, Modell 3). Die Chloridbestimmungen in den Zentrifugaten wurden mercurimetrisch in Anlehnung an die Vorschrift von Lapin[16] durch Titration mit 0,02 n Mercurinitrat unter Verwendung von Diphenylcarbazon als Indicator (1%ige alkoholische Lösung) durchgeführt.

Versuchsergebnisse

I. Einfluß der Erniedrigung der Natrium- und Chlorionenkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit auf die Spontanfreisetzung von Kaliumionen aus der Muskulatur

Etwa 2—3 min nach der Umschaltung auf die natrium- und chlorionenarme Durchströmungsflüssigkeit stieg in allen Versuchen die Differenz der venösen weniger der arteriellen Kaliumionenkonzentration (VA-Differenz) an beiden Extremitäten steil an und erreichte nach 8—10 min ein Maximum, das innerhalb der ersten 30 min nach der Umschaltung praktisch konstant blieb (Abb. 1). Zum Unterschied vom normal durchströmten innervierten und chronisch denervierten Muskel[14] trat demnach bei der natriumchloridarmen Durchströmung eine beträchtliche Spontanfreisetzung von Kaliumionen in Erscheinung. Tab. 1 enthält die in den einzelnen Versuchen 30 min nach der Umschaltung an innervierter und denervierter Extremität beobachteten Kaliumfreisetzungen zusammen mit den entsprechenden Durchflußgrößen und arteriellen Konzentrationen für Kalium-, Natrium- und Chlorionen.

Tabelle 1

Vers. Nr.	Arter. Konz. in mM/l			Innerv. Extrem.		Denerviert. Extr.	
	K^+	Na^+	Cl^-	Fluß in ml/min	Spont. K^+ Freis. in μM/min	Fluß in ml/min	Spont. K^+ Freis. in μM/min
KK 27	4,25	22,0	23,3	9,5	19,7	11,0	20,5
KK 28	4,00	13,0	17,0	11,7	18,7	15,0	28,0
KK 32	3,56	19,8	29,5	10,6	21,9	13,0	31,0
KK 33*	4,04	17,3	27,5	11,0	23,0	13,5	33,0
KK 34*	3,96	22,5	32,8	4,0	9,0	8,5	16,5
KK 35	3,96	24,0	35,5	6,8	7,4	8,5	9,2
KK 36	3,90	20,1	27,8	14,7 12,5**	22,0 23,0**	—	—
KK 37	4,11	20,7	29,9	9,9	15,0	8,7	15,0
Mittel:	3,97	19,9	27,9	10,1	17,7	11,1	21,8

* Durchströmung mit 10^{-5} M/l dTC.
** Extremität enthäutet.

Aus den Werten der Spalten 5—8 der Tab. 1 kann ersehen werden, daß zwischen den jeweiligen Durchflußgrößen und den dazugehörigen Werten für die Spontanfreisetzung ein Zusammenhang besteht. Die statistische Auswertung ergibt für die Beziehung zwischen Kaliumfreisetzung pro min (y) und Durchfluß pro min (x) die folgende Regressionsgleichung:

$$y = 3{,}38 + 2{,}17\ x, \quad r = 0{,}848, \quad P < 0{,}001.$$

Da die Werte der Spontanfreisetzung als Produkt der VA-Differenz für Kaliumionen und dem dazugehörigen Durchflußvolumen berechnet

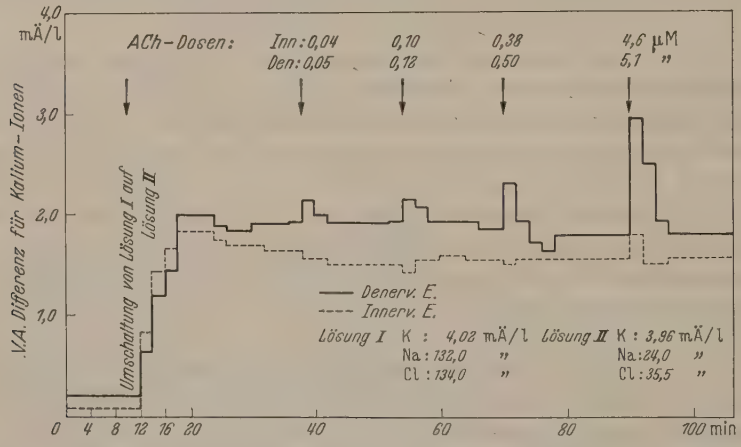


Abb. 1. Venoarterielle Konzentrationsdifferenzen der Kaliumionen an einer isoliert durchströmten innervierten (punktierter Kurvenzug) sowie chronisch denervierten (ausgezogener Kurvenzug) hinteren Extremität einer Katze (Chloralosenarkose). Beim ersten Pfeil: Herabsetzung der NaCl-Konzentration in der Durchströmungsflüssigkeit von 130—140 mM/l auf 20—30 mM/l. Weitere Pfeile: Intraarterielle ACh-Injektionen. Ordinate: Kaliumionen-VA-Differenz in mM/l; Abszisse: Zeit in Minuten

wurden, besagt obige Gleichung, daß die Kalium-VA-Differenz vor allem im Bereich größerer Durchflußvolumina weitgehend unabhängig vom Durchfluß war. Auch innerhalb der einzelnen Versuche konnte mehrmals beobachtet werden, daß druckbedingte Änderungen des Durchflusses zu keiner Veränderung der venösen Kaliumkonzentrationen und damit der VA-Differenzen führten. Dies spricht für eine Neueinstellung des durch die Erniedrigung der Natriumchloridkonzentration gestörten Gleichgewichtes zwischen der intra- und extracellulären Kaliumkonzentration, wobei auf Grund der Ergebnisse von BOYLE und CONWAY[1] die durch die Erniedrigung der Chlorionenkonzentration hervorgerufene Störung des DONNAN-Gleichgewichtes in erster Linie für die Neueinregulierung der Kaliumkonzentration in der ausströmenden Flüssigkeit verantwortlich gemacht werden muß.

Unmittelbar nach der Umschaltung von 130—140 mM/l auf 20 bis 30 mM/l NaCl stiegen die VA Differenzen der Natrium- und Chlorionen in allen Versuchen auf ein Vielfaches an, sanken jedoch dann mit fortschreitender Auswaschung des Natriumchlorides aus den extracellulären Gewebsanteilen wieder rasch ab. Etwa 25—30 min nach der Umschaltung trat ein annähernd stationärer Zustand ein; beide Ionen zeigten zu diesem Zeitpunkt noch eine positive VA-Differenz von 3—4 mM/l, die im Laufe der nächsten Stunde nur mehr wenig abnahm (siehe Abb. 2). In Tab. 2 sind die Mittelwerte der VA-Differenzen der Kalium-, Natrium- und Chlorionen von 7 Versuchen für den Zeitpunkt unmittelbar vor bzw. 30, 50, 70 und 90 min nach der Umschaltung auf die natriumchloridarme Durchströmung wiedergegeben.

Tabelle 2

Zeitpunkt	Innervierte Extremität VA-Differenzen in mM/l				Denervierte Extremität VA Differenzen in mM/l			
	K^+	Na^+	Cl^-	$\ominus$	K^+	Na^+	Cl^-	$\ominus$
Vor Umschaltung	+0,06	0	0	0	+0,15	0	0	0
30 min nach Umsch.	+1,78 ±0,16*	+3,6	+4,3	+1,1	+1,93 ±0,18*	+3,9	+3,8	+2,0
50 min „ „	+1,60 ±0,18*	+2,3	+2,7	+1,2	+1,84 ±0,23*	+2,6	+2,3	+2,1
70 min „ „	+1,57 ±0,25*	+1,9	+2,0	+1,5	+1,77 ±0,30*	+1,2	+1,5	+1,5
90 min „ „	+1,59 ±0,28*	+1,6	+1,4	+1,8	+1,72 ±0,30*	+0,9	+1,0	+1,6
Mittelwerte nach der Umschaltung	+1,63	+2,4	+2,6	+1,4	+1,81	+2,1	+2,1	+1,8

* Mittlerer Fehler des Mittelwertes.

Aus den in Tab. 2 wiedergegebenen Ergebnissen lassen sich für das Verhalten der Kaliumionen folgende Feststellungen treffen:

1. Die unmittelbar nach dem Konzentrationswechsel des NaCl in der Durchströmungsflüssigkeit auftretende Erhöhung der Kaliumkonzentration bzw. der VA-Differenz sinkt an beiden Extremitäten mit fortschreitender Versuchsdauer langsam auf 85—90% des 30-Minutenwertes ab.

2. In allen 4 beobachteten Zeitpunkten war die Steigerung der Kalium-VA-Differenz am denervierten Muskel etwas stärker als am innervierten ausgeprägt. (Zeitliche Mittelwerte: 1,8 gegenüber 1,6 mM/l).

Diese beiden Aussagen konnten auch statistisch durch eine 3fache Streuungszerlegung für alle den Mittelwerten der Tab. 2 zugrundeliegenden Einzelwerte der Kalium-VA-Differenz gesichert werden.

Streuungszerlegung

Art der Streuung	Anz. d. Freih.	Summe d. Abw. Quadr.	mittlere Abw. Quadr.
Zwischen den Katzen .	6	14,6521	2,4420*
Zwischen den Zeiten . .	3	0,3410	0,1136*
Zwischen den Extrem. .	1	0,4572	0,4572*
Wechselwirkung Katze/Zeit	18	2,6790	0,1488*
Wechselwirkung Katze/Extrem.	6	0,6803	0,1134*
Rest	21	0,2494	0,0118
Gesamt	55	19,0590	

* Statistisch gesichert $P < 0{,}01$.

Aus Tab. 2 geht weiterhin hervor, daß die positiven VA-Differenzen der Natrium- und Chlorionen zu allen Zeitpunkten nach der Umschaltung sowohl am innervierten wie auch am denervierten Muskel gleich groß waren.

Zur statistischen Sicherung dieses Befundes wurden von allen Einzelversuchen die Differenzen zwischen den VA-Konzentrationsdifferenzen des Natrium- und des Chlorions gebildet und für jeden Zeitpunkt und jede Extremität getrennt mittels eines Student-Testes geprüft, ob die Mittelwerte dieser Differenzen signifikant von 0 verschieden waren. Dies war in allen 8 Fällen (4 Zeitpunkte an je einer Extremität) nicht der Fall ($P > 0{,}1$).

Dies deutet nun darauf hin, daß der an beiden Extremitäten vor sich gehende dauernde Austritt von Kaliumionen in die Durchströmungsflüssigkeit zumindest ab der 30. min nach der Umschaltung weder durch einen Natriumeintritt noch durch einen Chlorionenaustritt elektrisch kompensiert wurde. Daraus ist weiter zu schließen, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen zugleich mit dem Kaliumaustritt ein Aus- bzw. Eintritt äquivalenter Mengen eines unbekannten Anions bzw. Kations vor sich gehen muß (siehe Tab. 2, Spalte 5 und 9). In erster Linie ist dabei an einen Austritt von Phosphat- und Laktationen zu denken, da in den Arbeiten von Embden und Mitarbeitern[5, 6] sowie von Fenn[11] nach Inkubation von Froschmuskeln in isotonischer Sacharose neben einer starken Atmungssteigerung ein rasch einsetzender Anstieg von freier Phosphorsäure in der Badeflüßigkeit sowie eine vermehrte intracelluläre Bildung von Milchsäure beobachtet wurde.

In zwei Versuchen (KK 33 und KK 34, Tab. 1) wurden beide Extremitäten während der gesamten Versuchsdauer mit 10^{-5} Mol/l dTC durchströmt. Die an beiden Extremitäten beobachteten Kaliumaustritte bzw. Kalium-VA-Differenzen lagen sogar etwas über dem Durchschnitt der übrigen Versuche, so daß ein hemmender Einfluß des dTC auf den durch

Erniedrigung der NaCl-Konzentration bedingten Kaliumaustritt mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

In Versuch KK 36 (Tab. 1) war eine Extremität vor Versuchsbeginn enthäutet worden. Kaliumfreisetzung und Verhalten der Natrium- und Chlorionen blieben gegenüber der normalen Extremität unverändert.

II. Kalium-, Natrium- und Chlorionenverschiebungen nach intraarteriellen Injektionen von ACh bei NaCl-armer Durchströmung

Die Versuche wurden erst 30 min nach der Umschaltung auf die natriumchloridarme Durchströmungsflüssigkeit begonnen, da die VA-

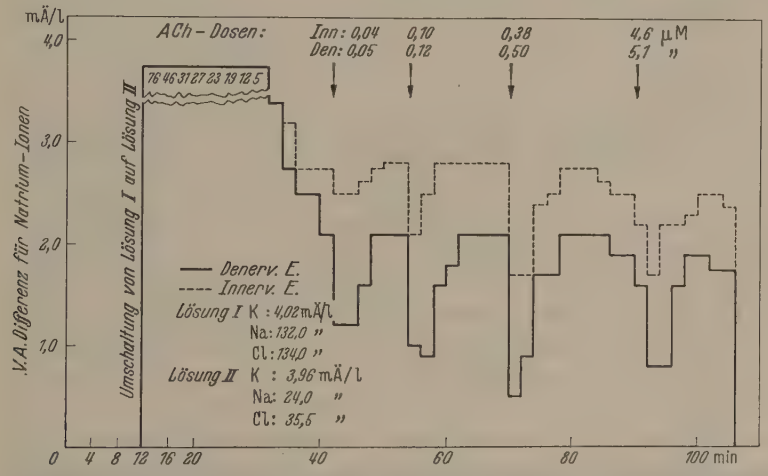


Abb. 2. Venoarterielle Konzentrationsdifferenzen der Natriumionen an einer isoliert durchströmten innervierten (punktierter Kurvenzug) sowie chronisch denervierten (ausgezogener Kurvenzug) hinteren Extremität einer Katze (Chloralosenarkose). Beim ersten Pfeil: Herabsetzung der NaCl-Konzentration in der Durchströmungsflüssigkeit von 130—140 mM/l auf 20—30 mM/l. Weitere Pfeile: Intraarterielle Injektionen von ACh; Ordinate: Natriumionen-VA-Differenz in mM/l; Abszisse: Zeit in Minuten

Differenzen der Kalium-, Natrium- und Chlorionen von diesem Zeitpunkt an nur mehr geringe spontane Veränderungen zeigten (Abb. 1 und 2). Von den insgesamt 7 Versuchstieren reagierten auf ACh 3 mit Durchflußsteigerungen (maximal 20—30%), 2 mit Durchflußsenkung, der Rest zeigte keinerlei Durchflußveränderungen. Ein 8. Versuch mußte wegen eines absoluten und persistierenden Gefäßspasmus nach der ersten ACh-Injektion abgebrochen werden. Die zum Zeitpunkt der ACh-Injektionen vorherrschenden arteriellen Konzentrationen betrugen im Durchschnitt: 4,0 mM/l K^+, 20 mM/l Na^+ und 28 mM/l Cl^- (bez. Einzelwerte siehe Tab. 1). Die in den 7 Versuchen an innervierten und denervierten Extremitäten durch ACh hervorgerufenen Änderungen in der ausströmenden Flüssigkeit lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

Tabelle 3

Versuch Nr.	Den. Zeit in Tagen	innerviert						denerviert					
		ACh-Dose in μM	log ACh-Dosis	K^+ Verschiebung in μM	Na^+ Verschiebung in μM	Cl Verschiebung in μM	Fluß in cm³/min	ACh-Dosis in μM	log ACh-Dosis	K^+ Verschiebung in μM	Na^+ Verschiebung in μM	Cl^- Verschiebung in μM	Fluß in cm³/min
KK 27	13	4,0	0,602	+ 7,0	— 87	— 53	10	4,85	0,685	*D*	— 99	—	11
KK 27	13	—	—	—	—	—	—	4,85	0,685	+ 28,5	— 75	0	13
KK 27	13	22,0	1,342	+ 19,5	— 142	— 68	15	22,0	1,342	+ 58	— 37	— 20	15
KK 29	13	1,05	0,021	*D*	— 75	— 42	8	1,16	0,064	+ 17	— 54	— 55	8,5
KK 29	13	1,85	0,269	*D*	— 27	0	9	2,58	0,412	+ 33,5	— 34	0	11
KK 31	—	8,3	0,919	+ 5,0	— 85	— 76	11						
KK 32	8	1,98	0,297	0	— 145	— 80	17	2,27	0,356	+ 17	— 97	— 49	18
KK 32	8	8,90	0,949	+ 10	— 45	— 40	12	8,90	0,949	+ 27	— 70	— 10	12
KK 35	10	0,041	0,612 — 2	0	— 12	0	8	0,04	0,672 — 2	+ 6,5	— 36	— 12	9,5
KK 35	10	0,10	0,000 — 1	0	— 15	— 6	8	0,12	0,093 — 1	+ 8	— 51	— 38	9,0
KK 35	10	0,38	0,579 — 1	0	— 47	— 18	18,0	0,50	0,699 — 1	+ 11,5	— 71	— 27	11,0
KK 35	10	4,60	0,663	+ 9	— 59	— 28	10,5	5,18	0,714	+ 47,5	— 49	— 10	12,0
KK 35	10	24,0	1,380	—	—	—	11,0	39,0	1,591	+ 74	— 96	— 39	15,0
KK 36	—	0,1	0,000 — 1	0	0	0	20,0						
KK 36		0,12	0,079 — 1	0	0	0	21,0						
KK 36		0,41	0,613 — 1	0	— 20	0	20,0						
KK 36		0,47	0,672 — 1	0	— 56	0	20,0						
KK 36		4,25	0,628	+ 5	— 53	— 38	19,0						
KK 36		21,80	1,338	+ 16	— 41	— 51	15,0						
KK 36		22,4	1,350	+ 17,5	— 112	— 48	16,0						
KK 37	11	0,02	0,380 — 2	0	0	0	11,0	0,02	0,301 — 2	0	0	0	10,5
KK 37	11	0,04	0,672 — 2	0	0	0	12	0,04	0,612 — 2	+ 7,0	0	0	10,5
KK 37	11	0,50	0,698 — 1	0	— 63	— 15	12	0,39	0,591 — 1	+ 12,5	— 31	0	10,5
KK 37	11	4,90	0,690	+ 3,5	— 39	— 27	12	3,95	0,596	+ 21,5	— 30	— 12	10,5
KK 37	11	25,0	1,398	+ 14,0	— 48	— 25	13	19,3	1,285	+ 25,0	— 41	— 20	10,0

D = Dauerdepolarisation.

1. Unmittelbar nach den einzelnen Injektionen trat an der innervierten Extremität ab Dosen von 3—4,0 μM ACh (680—900 μg) und an der denervierten Extremität ab Dosen von 0,04—0,05 μM ACh (9—11 μg) eine je nach der Dosis 4—8 min lang andauernde weitere Erhöhung der VA-Differenz für Kaliumionen ein. Abb. 1 gibt den zeitlichen Ablauf dieser Konzentrationserhöhungen nach 4 verschiedenen ACh-Dosen wieder.

2. Im gleichen Dosenbereich von ACh konnte unmittelbar nach den Injektionen eine vorübergehende und durchschnittlich 8—10 min andauernde Herabsetzung der positiven VA-Differenz der Natriumionen beobachtet werden, wobei hier zwischen innerviertem und denerviertem Muskel kein deutlich sichtbarer Unterschied zu bemerken war. Abb. 2 gibt ein derartiges Versuchsergebnis nach 4 verschiedenen ACh-Dosen wieder.

3. In ähnlicher Weise wie bei den Natriumionen konnte auch bei den Chlorionen im Anschluß an die ACh-Injektionen in einer Reihe von Versuchen eine vorübergehende Verringerung der VA-Differenz festgestellt werden. Der Effekt war jedoch geringer als bei den Natriumionen und außerdem nicht bei allen Versuchen zu beobachten.

Zur quantitativen Auswertung der Versuchsergebnisse wurden die tatsächlich nach ACh aus- bzw. eintretenden Ionenmengen als Produkte der jeweiligen Durchflußmengen mit den Steigerungen bzw. Senkungen der VA-Differenzen über bzw. unter den Ausgangswert berechnet. Als Ausgangswert wurde hierbei ein Mittelwert zwischen dem jeweiligen Wert der VA-Differenz vor der ACh-Injektion und dem 10—12 min nach der Injektion konstant auftretenden Wert genommen. Die auf diese Weise in den einzelnen Versuchen nach verschiedenen ACh-Dosen an innervierter und denervierter Extremität bestimmten Verschiebungen der Kalium-, Natrium- und Chlorionen sind in Tab. 3 wiedergegeben. (+Werte bedeuten dabei Freisetzung aus und —Werte Eintritt in die Muskulatur.)

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde in der Weise vorgenommen, daß zunächst nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate die Regressionsgleichungen für die Dosisabhängigkeit der einzelnen Ionenverschiebungen berechnet wurden. Hierbei wurden folgende Beziehungen erhalten:

Kalium:

Innervierte Extremität: $y_K = -49{,}48 + 15{,}07\,x$ (I)
$r = 0{,}88, \quad P < 0{,}001$
Konf. Interv. für die Regression: $10{,}55 < \beta < 19{,}59$

Denervierte Extremität: $y_K = -26{,}07 + 16{,}23\,x$ (II)
$r = 0{,}83, \quad P < 0{,}001$
Konf. Interv. für die Regression: $9{,}53 < \beta < 22{,}93$

Natrium:

Innervierte Extremität: $y_{Na} = +39{,}37 - 29{,}34\,x$ (III)
$r = -0{,}67, \quad P < 0{,}001$
Konf. Interv. für die Regression: $-14{,}73 < \beta < -44{,}07$

Denervierte Extremität: $y_{Na} = +3{,}54 - 17{,}36\,x$ (IV)
$r = -0{,}57, \quad 0{,}02 > P > 0{,}01$
Konf. Interv. für die Regression: $-3{,}87 < \beta < -30{,}85$

In diesen Gleichungen bedeuten: y die jeweiligen Ionenverschiebungen in μM, x den Logarithmus der ACh-Dosis in $\mu M \cdot 10^3$, und r den Korrelationskoeffizienten. Die Konfidenzintervalle der Regressionskoeffizienten wurden in derselben Weise wie in[14] für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $P = 0{,}05$ berechnet.

Außerdem wurden nach einem in[14] näher beschriebenen Verfahren für Gl. (I) bis (IV) die Konfidenzintervalle der zu den einzelnen ACh-Dosen gehörigen Mittelwerte der Kaliumausschüttung sowie Natriumeintritt für $P = 0{,}05$ berechnet und zusammen mit den Geraden sowie den in Tab. 3 enthaltenen Einzelergebnissen in Abb. 3 graphisch dargestellt.

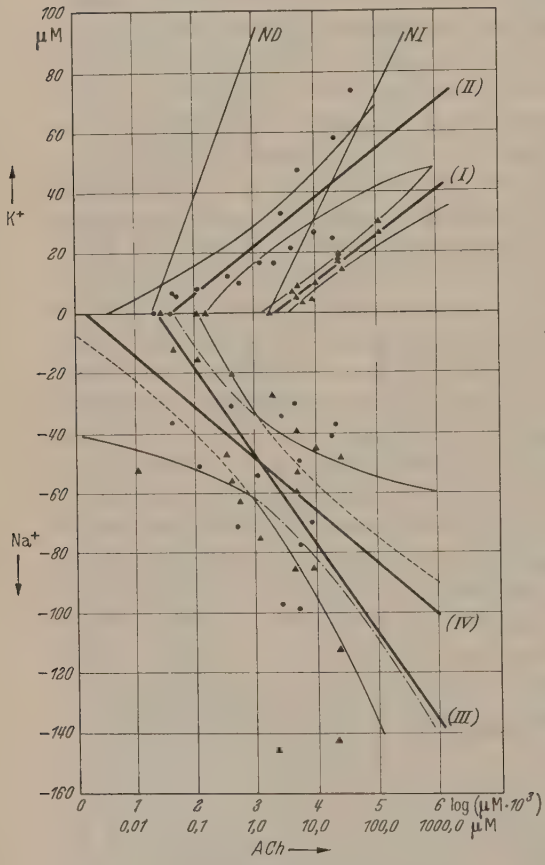


Abb. 3. Dosis Wirkungskurven der Kaliumfreisetzung bzw. des Natriumeintrittes durch ACh an der isoliert durchströmten innervierten sowie chronisch denervierten Katzenextremität nach Herabsetzung der extracellulären NaCl-Konzentration auf 20—30 mM/l. Geschwungene Kurven: Konfidenzintervalle der Dosis-Wirkungsgeraden. (I): Kaliumfreisetzung innervierte Muskulatur; — (II): Kaliumfreisetzung denervierte Muskulatur; — (III): Natriumeintritt innervierte Muskulatur; — (IV): Natriumeintritt denervierte Muskulatur; — (NI): Kaliumfreisetzung innervierte Muskulatur bei normaler Durchströmung; — (ND): Kaliumfreisetzung denervierte Muskulatur bei normaler Durchströmung. Meßpunkte oberhalb der Nullinie: Kaliumfreisetzung in μM; Meßpunkte unterhalb der Nullinie: Natriumeintritt in μM; — Dreiecke: innervierter Muskel; — Punkte: Denervierter Muskel. — Abszisse: Logarithmen der ACh-Dosen in $\mu M \cdot 10^3$

Die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse läßt nun folgendes erkennen:

1. Die zu einer Kaliumfreisetzung führenden Grenzdosen des ACh sind weder am innervierten noch am denervierten Muskel signifikant gegenüber den Versuchen mit normaler Durchströmungsflüssigkeit verschieden. Ebenso ist auch der Unterschied zwischen denerviertem und innerviertem Muskel erhalten geblieben. (Vergleich der Abszissenschnittpunkte der Geraden (I) und (II) mit denen der Geraden *NI* und *ND* aus[14]).

2. Die Dosis-Wirkungskurven der Kaliumfreisetzung verlaufen an innervierter- und denervierter Extremität bei natriumarmer Durchströmung wesentlich flacher als bei Durchströmung mit normaler NaCl-Konzentration (Abb. 3, Vergl. (I) u. (II) mit *NI* und *ND*).

3. Die Konfidenzbereiche der Dosis-Wirkungskurven des Natriumeintrittes von denerviertem und innerviertem Muskel sind infolge einer ziemlich hohen Streuung im gesamten untersuchten Dosenbereich von ACh miteinander verschmolzen. Demzufolge besteht weder in den Grenzdosen des ACh noch in den Steigungen der Regressionsgeraden zwischen innerviertem und denerviertem Muskel ein signifikanter Unterschied.

4. Ein Vergleich der Konfidenzbereiche der Steigungen der Geraden (I) bis (IV) ergibt, daß die Regressionskoeffizienten der Kaliumverschiebungen nur dem Vorzeichen, jedoch nicht dem Absolutbetrag nach von den Regressionskoeffizienten der Natriumverschiebungen signifikant verschieden sind.

5. Die ACh-Grenzdosen des Natriumeintrittes fallen an denerviertem und innerviertem Muskel in den Konfidenzbereich der Grenzdosen des Kaliumeintrittes am denervierten Muskel, sind jedoch signifikant von den Grenzdosen der Kaliumfreisetzung am innervierten Muskel verschieden.

Die Einzelwerte der Chloridverschiebungen zeigten eine größere Streuung als die der Natriumverschiebungen und besaßen nur mehr am innervierten Muskel eine signifikante Korrelation ($\beta = -22{,}15$, $r = -0{,}72$).

Die Gesamtbilanz der Ionenverschiebungen nach 21 Injektionen ergibt am innervierten Muskel eine Freisetzung von 106 μM K^+- gegenüber einem Eintritt von 1170 μM Na^+- und 573 μM Cl^--Ionen, wobei ein Ladungsdefizit entsprechend einem Eintritt von 491 μM Anionen in Erscheinung tritt. Am denervierten Muskel wurde in 16 Versuchen eine Freisetzung von 395 μM Kalium- und

Tabelle 4

Versuch Nr.	Den. Zeit in Tagen	innerviert						denerviert					
		ACh-Dos. in μM	log ACh-Dos.	K^+ Verschiebung in μM	Na^+ Verschiebung in μM	Cl^- Verschiebung in μM	Fluß in cm³/min	ACh-Dos. in μM	log ACh-Dos.	K^+ Verschiebung in μM	Na^+ Verschiebung in μM	Cl^- Verschiebung in μM	Fluß in cm³/min
KK 33*	8	1,98	0,296	0	0	0	10	2,45	0,389	0	0	0	14
KK 33*	8	7,70	0,886	0	0	0	13	10,0	1,000	0	0	0	15
KK 33*	8	19,5	1,290	0	0	0	10	24,7	1,392	0	— 22	— 11	14
KK 34*	8	3,4	0,531	0	0	0	8	5,5	0,746	0	0	0	13
KK 34*	8	16,8	1,225	0	0	0	8	27,2	1,434	0	— 27	— 10	14

* Durchströmung mit 10^{-5} M/l d-Tubocurarin

ein Eintritt von 792 μM Natrium- bzw. 292 μM Chlorionen beobachtet; für eine neutrale Ladungsbilanz fehlen hier nur 105 μM eintretende Anionen.

An zwei Versuchstieren wurden die Wirkungen von intraarteriellen ACh-Injektionen bei Durchströmung mit natriumchloridarmer Lösung unter gleichzeitigem Zusatz von dTC in einer Konzentration von 10^{-5} M/l untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 enthalten.

Als Ergebnis kann festgestellt werden, daß weder an der innervierten noch an der denervierten Extremität eine Kaliumfreisetzung durch ACh bei gleichzeitiger Anwesenheit von 10^{-5} Mol/l dTC zu beobachten war. Ein Natrium- und Chlorideintritt konnte nur an der denervierten Extremität nach den beiden hohen Dosen (24 und 27 μM ACh) nachgewiesen werden.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Die in Abschnitt I mitgeteilten Versuche ergaben, daß durch Konzentrationsänderung in der Durchströmungsflüssigkeit von 130 mM/l Na^+ bzw. 138 mM/l Cl^- auf rund 20 mM/l Na^+ bzw. 28 mM/l Cl^- eine konstant höhere Einstellung der Kaliumausflußkonzentration von rund 4,0 auf 5,6—5,8 mM/l eintritt. Der damit verbundene dauernde Austritt von Kaliumionen aus dem Inneren der Muskelfasern läßt auf eine Änderung des Membranpotentials im Sinne einer Erniedrigung (Depolarisation) schließen. Nach der heute allgemein anerkannten Auffassung des Ruhepotentials als Donnan-Potential (Boyle u. Conway[1], siehe auch die neuerliche Nachprüfung von Mond[17]), ist die unter den Versuchsbedingungen des Abschnittes I beobachtete Kaliumfreisetzung bzw. Membrandepolarisation in erster Linie durch die Herabsetzung der extracellulären Chloridkonzentration zu erklären. Der Zusammenhang von Ruhepotential der Muskelfasermembran mit der extracellulären Kalium- bzw. Chlorionenkonzentration ist dabei durch folgende Gleichungen gegeben:

$$E_r \text{ (in mV)} = 58 \cdot \log K_i/K_a = 58 \log Cl_a/Cl_i \qquad \text{(V)}$$

daraus folgt als Gleichsgewichtsbedingung:

$$K_i \cdot Cl_i = K_a \cdot Cl_a. \qquad \text{(VI)}$$

Unter Zugrundelegung des von Creese[4] für den Säugetiermuskel in vivo bestimmten Wertes von K_i/K_a von rund 34 errechnen sich demnach aus dem Chlorionenkonzentrationsverhältnis unmittelbar nach der Umschaltung bzw. aus dem Kaliumionenkonzentrationsverhältnis nach Einstellung einer konstanten Kaliumausflußkonzentration Werte von —39 mV bzw. —9 mV als obere bzw. untere Grenze der durch die Umschaltung bewirkten Erniedrigung des Membran-Ruhepotentials. Eine

genauere Angabe der Größe der zu erwartenden Depolarisation ist nicht möglich, da hierzu eine genauere Kenntnis der intracellulären Kalium- bzw. Chlorionenkonzentrationsveränderungen notwendig wäre; dies ist jedoch nicht zuletzt auch wegen der unter unseren Versuchsbedingungen zu erwartenden Wasserverschiebungen (durch Herabsetzung der Konzentration des diffusiblen Anions bei Aufrechterhaltung der osmotischen Gesamtkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit durch Sacharosezusatz, siehe Boyle u. Conway[1]) unmöglich.

In einer Reihe von Arbeiten über den Einfluß der Erniedrigung der extracellulären Natriumchloridkonzentration auf die direkte[20, 21, 23] oder indirekte[10] Erregbarkeit des Muskels wurde eine Membrandepolarisation durch Herabsetzung der Chloridkonzentration überhaupt nicht berücksichtigt. Dies dürfte zum Teil auf die alten Arbeiten Overtons[20, 21] zurückzuführen sein, wonach die Erholung der direkten Erregbarkeit von Froschmuskeln, die vorher der Einwirkung einer natriumchloridfreien Sacharoselösung ausgesetzt waren, durch Zusatz von Natriumsalzen ohne Unterschied auf die Natur des Anions erfolgt bzw. nach Schwarz[22] bei Verwendung indiffusibler Anionen wie Sulfat sogar besser als bei Chlorid vor sich geht. Andere Autoren hingegen konnten nach längerer Inkubation von Froschmuskeln in isotonischer Sacharose eine wenn auch geringgradige Herabsetzung des Ruhepotentials nachweisen (Fenn[11], Nastuk[19]).

Das durch indirekte Reizung bzw. direkte lokale Einwirkung von ACh ausgelöste Endplattenpotential wird durch Herabsetzung der extracellulären NaCl-Konzentration erniedrigt[11, 18, 19]. Die ursprüngliche Ansicht von Fatt u. Katz[10] wonach die Wirkung des Natriumionenentzuges hauptsächlich auf einer Hemmung der Freisetzung von ACh aus den Nervenendigungen beruht, wurde von Del Castillo u. Katz[3] später weitgehend widerrufen. Nastuk[18] schreibt der Herabsetzung der extracellulären Natriumchloridkonzentration einen störenden Einfluß auf einen durch ACh hervorgerufenen aktiven Natriumioneneintritt zu.

Aus den in Abschnitt II mitgeteilten Versuchsergebnissen geht hervor, daß die Kaliumfreisetzung durch ACh an innervierter und denervierter Muskulatur durch Herabsetzung der extracellulären NaCl-Konzentration deutlich verringert wird. Die Abschwächung der Kaliumfreisetzung bezieht sich jedoch nicht auf die Grenzdosen von ACh, die gegenüber der normalen Durchströmung nahezu unverändert sind, sondern vor allem auf die Steilheit der Regressionslinien an innervierter und denervierter Muskulatur.

Die Steigung dieser Dosis-Wirkungkurven ist nach[14] Gl. XIII mit dem pro Zeiteinheit durch die Einheit der Endplattenfläche bei der Konzentrationsdifferenz 1 Mol/l erfolgenden Kaliumdurchtritt P durch folgende Beziehung verknüpft:

$$\beta = \frac{A \cdot P \cdot (C_i - C_a)}{k_l}, \qquad \text{(VII)}$$

wobei A die Gesamtendplattenfläche einer Extremität in cm², C_i und C_a die intra- bzw. extracelluläre Kaliumkonzentration und k_l die Zeitkonstante des Konzentrationsabfalles von ACh in der Extracellulärflüßigkeit bedeuten. Setzt man für β den

Mittelwert der beiden an innervierter und denervierter Extremität bei NaCl-armer Durchströmung gefundenen Regressionskoeffizienten aus Gl. (I) bzw. Gl. (II) in Gl. (VII) ein, so erhalten wir die folgende Gleichung, wobei der Wert von $\beta = 15{,}6$ noch wegen der Umrechnung von μM auf Mol mit 10^{-6} multipliziert werden muß:

$$P = \frac{1{,}56 \cdot 10^{-5} \cdot k_l}{A \cdot (C_i - C_a)}.$$

Unter Verwendung der in [14] angegebenen Werte für k_l ($5 \cdot 10^{-2}$ sec^{-1}), A (10^2 cm^2) und (C_i—C_a) (10^{-1} M/l), läßt sich für P ein Wert von $0{,}78 \cdot 10^{-7}$ errechnen.

Für die normale Endplatte wurde von Fatt[7] für P ein Wert von $2{,}7 \cdot 10^{-7}$ cm sec^{-1} und für die curarisierte Endplatte des denervierten Muskels (10^{-5} M/l dTC) von Kraupp u. a.[15] ein Wert von $0{,}94 \cdot 10^{-7}$ cm sec^{-1} angegeben. Beim Vergleich an der denervierten Muskulatur ist daher der bei Herabsetzung der NaCl-Konzentration auf $^1/_5$—$^1/_6$ des normalen Tyrodewertes nach intraarteriellen Injektionen von ACh auftretende Kaliumaustritt durch die Endplatten noch etwas niederer als nach Einwirkung von 10^{-5} M/l dTC und rund 3—4mal niedriger als unter Normalbedingungen. Bei gleichzeitiger Einwirkung von dTC (10^{-5}M/l) und Herabsetzung der NaCl-Konzentration in der Durchströmungsflüssigkeit konnte im ganzen untersuchten Dosenbereich von ACh weder an der innervierten noch an der denervierten Muskulatur eine nachweisbare Kaliumfreisetzung beobachtet werden. An der normal durchströmten denervierten Extremität war jedoch selbst unter 10^{-5} M/l dTC eine schwache jedoch einwandfreie Kaliumausschüttung nachweisbar[15]. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fatt u. Katz[10], wonach dTC und Herabsetzung der extracellulären Natriumionenkonzentration sich in ihrer Wirkung auf das Endplattenpotential gegenseitig verstärken.

Was nun den Mechanismus der abschwächenden Wirkung der Erniedrigung der extracellulären NaCl-Konzentration auf den durch ACh hervorgerufenen Kaliumaustritt anbetrifft, so soll hier noch folgendes angeführt werden:

1. Es ist als sicher anzunehmen, daß sich die durch Erniedrigung der Chlorionenkonzentration hervorgerufene Depolarisation auch auf die Endplattenmembran erstreckt und daher die in Abschnitt I beschriebene Dauerfreisetzung der Kaliumionen vor Beginn der ACh-Injektionen zu einem Teil durch die Endplatte erfolgt. Die durch die ACh-Injektion hervorgerufene zusätzliche Depolarisation nimmt daher von einem niedrigeren Wert des Membranpotentials als bei normaler Durchströmung ihren Ausgang, wodurch eine Abschwächung des rein durch ACh verursachten Kaliumaustrittes entsteht.

2. In den vorliegenden Versuchen konnte sowohl an der innervierten wie auch an der denervierten Extremität nach intraarteriellen Injektionen von ACh ein vorübergehender Eintritt von Natriumionen beobachtet werden. Am innervierten Muskel waren die hierfür erforderlichen Grenzdosen von ACh bedeutend niedriger als für die Kaliumfreisetzung

(siehe Abb. 3). Gemessen an den Steigungen der Dosis Wirkungsgeraden waren der nach gleichen ACh-Dosen an der denervierten Extremität erfolgende Natriumeintritt bzw. Kaliumaustritt von annähernd gleicher Größe (Abb. 3). Unter Berücksichtigung der Tatsachen, daß einerseits unter den vorliegenden Versuchsbedingungen der Gradient zwischen intra- und extracellulärer Natriumionenkonzentration mehr als 10fach niedriger als der entsprechende Wert für die Kaliumkonzentrationen, andererseits auch die Diffusionskonstante der Natriumionen kleiner als die der Kaliumionen ist (siehe KEYNES[13], Seite 363), lassen sich folgende Erwägungen anstellen: Eine Beibehaltung der Gedankengänge der „Kurzschlußtheorie" zur Beschreibung der Ionenverschiebungen nach ACh-Einwirkung erfordert nunmehr die zusätzliche Annahme, daß die Austrittsgeschwindigkeit der Kaliumionen durch die Diffusionsgeschwindigkeit der einwärts wandernden Natriumionen in irgendeiner Weise begrenzt wird, somit ein Austausch der beiden Alkaliionen gegeneinander gekuppelt und mit der Diffusionsgeschwindigkeit des langsamer wandernden Ions erfolgt. Im anderen Falle müßte dem Natriumeintritt ein grundsätzlich anderer Wirkungsmechanismus als dem Kaliumaustritt zugeschrieben werden, wie er von NASTUK[18] in Analogie zur Depolarisation am Nerven als primärer aktiver Natriumtransport angenommen wurde. Da auch im Falle eines aktiven Natriumeintrittes Grad und Dauer der Depolarisation von der extracellulären Natriumkonzentration abhängen[12], liefern somit beide Annahmen über die Natur der durch ACh hervorgerufenen Ionenverschiebungen eine hinreichende Erklärung für die Beobachtung der geringeren Kaliumfreisetzung nach Herabsetzung der extracellulären Natriumkonzentration.

Im Gegensatz zum Verhalten der Kaliumfreisetzung konnte im Verlauf der Dosis-Wirkungskurven des Natriumeintrittes kein signifikanter Unterschied zwischen innervierter und chronisch denervierter Extremität gefunden werden (siehe auch Abb. 3). Unter Beibehaltung des Analogieschlusses zur Nerverregung könnte dies dahingehend gedeutet werden, daß die durch den Natriumeintritt bewirkte primäre Endplattendepolarisation an innervierter und denervierter Muskulatur in gleicher Weise vor sich geht, daß aber die durch den Kaliumaustritt angezeigte Dauer der Depolarisation an der denervierten Muskulatur um vieles länger als an der innervierten währt. In diesem Zusammenhange gewinnt auch der Befund von WERNER u. a.[24] an Bedeutung, wonach das einfach gebaute und keinem fermentativen Abbau zugängliche Tetramethylammoniumion an innvervierter und denervierter Muskulatur eine nahezu gleichstarke Kaliumausschüttung hervorruft. Es liegt in diesem Falle der Schluß nahe, daß die hinsichtlich der Kaliumfreisetzung geringere Empfindlichkeit des innervierten Muskels gegenüber ACh auf einer nur für ACh spezifischen Abkürzung der Dauer der depolarisierenden Wirkung

beruht; dies kann jedoch nicht ausschließlich auf der hydrolytischen Spaltung des ACh durch die Cholinesterasen beruhen, wie ein Vergleich des Verlaufes und der Dauer der Kaliumfreisetzung durch Tetramethylammoniumbromid mit der durch ACh allein sowie ACh und gleichzeitiger Eserindurchströmung erkennen läßt[15, 24].

Summary

The release of potassium- from and the uptake of sodium ions into striated muscle following intraarterial injection of acetylcholine (ACh) were investigated by isolated perfusion of hind limbs of cats. The perfusion was carried out with reduced sodium- and chloride concentration and the reactions of normal innervated and chronically denervated muscles were compared in the same animal. The following results were obtained:

1. Inmediately after the reduction of the sodium chloride concentration in the perfusion liquid (from approximately 135 mM/l to 20—30 mM/l) a sudden increase in the potassium concentration of the venous out- flow occurred from 4,0 mM/l to 5,6 mM/l (inn. extr.) and to 5,8 mM/l (den. extr.). This increase of the potassium outflow concentration remained constant over $1^1/_2$ hours and was independent of the perfusion rate; it was not influenced by addition of 10^{-5} M/l d-tubocurarine to the perfusion liquid.

2. In all experiments 30 min after the reduction of the sodium chloride concentration a continous release of sodium- and chloride ions of equal magnitude was observed and therefore the potassium lost from the muscle must have been compensated by concommittant release of another anion (probably phosphate).

3. After intraarterial injection of ACh a temporary release of potassium ions together with a temporary uptake of sodium- and chloride ions on both denervated and innervated muscle could be observed. The threshold doses of ACh necessary for the potassium release were the same as in the experiments with normal sodium chloride concentration, whereas the regression coefficients were only $^1/_3$ of the values obtained with normal sodium chloride concentration in the perfusion liquid.

4. The threshold doses and regression coefficients for the sodium uptake into innervated- and denervated muscle were practically of the same order of magnitude and their absolute values did not differ significantely from the corresponding ones for the potassium output in the denervated limb.

5. Both in the innervated and in the chronically denervated muscle the potassium output as well as sodium- and chloride uptake could be abolished by the presence of 10^{-5} M/l d-tubocurarine for practically all doses of ACh.

An dieser Stelle möchte ich den Herren Dr. H. P. Clodi, W. Kobinger und H. Stormann meinen Dank für ihre Hilfe bei den Experimenten aussprechen.

Literatur

[1] Boyle, P. J., and E. J. Conway: Potassium accumulation in muscle and associated changes, J. of Physiol. **100**, 1—63, (1941). — [2] Castillo J. del, and B. Katz: The membrane change produced by the neuromuscular transmitter, J. of Physiol. **125**, 546—565 (1954). — [3] Castillo J. del, and B. Katz: Local activity at a depolarized nerve muscle junction, J. of Physiol. **128**, 396—411 (1955). — [4] Creese, R.: Measurement of cation fluxes in rat diaphragm, Proc. Roy. Soc. Ser. B. **142**, 497—513 (1954). — [5] Embden, G., und E. Adler: Über die physiologische Bedeutung des Wechsels des Permeabilitätszustandes von Muskelfasergrenzschichten, Hoppe-Seyler's Z. **118**, 1—49 (1922). — [6] Embden, G., und H. Lange: Muskelatmung und Sarkoplasma, Hoppe-Seyler's Z. **125**, 258—283 (1923). — [7] Fatt, P.: The electromotive action of acetylcholine at the motor endplate, J. of Physiol. **111**, 408—422 (1950). — [8] Fatt, P., and B. Katz: An analysis of the endplate potential recorded with an intracellular electrode, J. of Physiol. **115**, 320—370 (1951). — [9] Fatt, P., and B. Katz: The electrical activity of the motor endplate (In discussion on excitation and inhibition), Proc. Roy. Soc. Ser. B, **140**, 183—186 (1952). — [10] Fatt, P., and B. Katz: The effect of sodium ions on neuromucsular transmission, J. of Physiol. **118**, 73—87 (1952). — [11] Fenn, W. O.: The oxygen consumption of muscles made nonirritable by sugar solutions, Amer. J. Physiol., **97**, 635—645 (1931). — [12] Hodgkin, A. L.: The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle, Biologic. Rev. **26**, 339—409 (1951). — [13] Keynes, R. D.: The ionic fluxes in frog muscle, Proc. Roy. Soc. Ser. B, **142**, 359—382 (1954). — [14] Kraupp, O., G. Werner, W. Kobinger und H. Stormann: Freisetzung von Kaliumionen aus der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur durch intraarterielle Injektionen von Azetylcholin, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 301—318 (1955). — [15] Kraupp, O., W. Kobinger, H. Stormann und G. Werner: Über den Einfluß von Eserin und d-Tubocurarin auf die Freisetzung von Kaliumionen aus der Skeletmuskulatur durch Acetylcholin, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 403—416 (1955). — [16] Lapin, L. N.: Mercurimetrische Methode der Mikrobestimmung der Chloride im Blut, Biochimija **19**, 521 (1954). — [17] Mond, R.: Transport von K, Cl und Wasser durch die Muskelfasermembran, Pflügers Arch., **261**, 243—248 (1955). — [18] Nastuk, W. L.: The electrical activity of the muscle cell membrane at the neuromuscular junction, J. Cellul. a. Comp. Physiol, **42**, 249—272 (1953). — [19] Nastuk, W. L.: Relation between extracellular Na^+ and the depolarizing action of acetylcholine on the end plate membrane, Federat. Proc. **13**, 104 (1954). — [20] Overton, E.: Über die Unentbehrlichkeit von Natrium- (oder Lithium-) Ionen für den Contractionsact des Muskels, Pflügers Arch. **92**, 346—386 (1902). — [21] Overton, E.: Studien über die Wirkung der Alkali- und Erdalkalisalze auf Skeletmuskulatur und Nerven, Pflügers Arch. **105**, 176—290 (1904). — [22] Schwarz, C.: Über Ermüdung und Erholung von Froschmuskeln unter dem Einfluß von Natriumsalzen, Pflügers Arch. **117**, 161—216 (1907). — [23] Taugner, R., M. Taugner, Th. Lohmüller und A. Fleckenstein: Über die Ursache der Muskeladynamie bei Nebennierenrindeninsuffizienz, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **210**, 219—235 (1949). — [24] Werner, G., O. Kraupp, W. Kobinger und H. Stormann: Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch Tetramethylammoniumbromid, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 1—11 (1955).

Dr. Dr. Otto Kraupp,
Pharmakol. Institut d. Univ. Wien IX/71, Währingerstr. 13a (Österr.)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 288—301 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. F. Heim)

Nachweis und Bestimmung mehrerer Coenzym-A-Verbindungen in der Leber von Meerschweinchen

Von
Fred Leuschner

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Dezember 1955)

In den vergangenen Jahren wurde dem Coenzym A[1] wegen seiner Beteiligung an fundamentalen biologischen Prozessen besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Dieses Interesse kann auf Lipmann zurückgeführt werden, der CoA als notwendige Komponente für die Acetylierung von Sulfanilamid in der Leber erkannte.

Fast zur gleichen Zeit beobachteten Nachmansohn und Berman, Feldberg und Mann und Lipton und Barron, daß CoA ebenfalls als Aktivator für die Synthese von Acetylcholin benötigt wird. In den folgenden Jahren wurde die funktionelle Bedeutung des CoA für die Übertragung von Carbonsäuren im Citronensäurezyklus, bei der Fettsäuresynthese und -oxydation, bei der Synthese von Steroiden, Fetten und Porphyrinen, sowie der Acylierung von Arylaminen, Histamin, Aminosäuren, Glucosamin u. a. erschlossen. CoA wirkt bei diesen Umsetzungen als Katalysator, indem sich seine funktionelle Gruppe mit den zu übertragenden Carbonsäuren zu einer energiereichen Verbindung zusammenschließt. Aus dieser Bindung werden die Carbonsäuren dann durch spezifische Fermente auf Akzeptoren (z. B. Cholin) überführt. Was den chemischen Aufbau des in der belebten Natur weit verbreiteten CoA betrifft, so haben Untersuchungen der Arbeitskreise um Lipmann und Snell ergeben, daß es sich um ein Dinucleotid handelt, das neben Adenosin und Phosphorsäuren Pantethein enthält, das einen aus Pantothensäure und Thioäthanolamin aufgebauten Wuchsstoff für Mikroorganismen (Lactobacillus bulgaricus-Faktor) darstellt.

Novelli und Lipmann entdeckten die Abhängigkeit der Acetatverbrennung vom CoA-Gehalt der Zelle. Lynen u. Mitarb. ergänzten diese Beobachtung, indem sie umgekehrt die Abhängigkeit des CoA-Gehaltes von der Acetatverbrennung auffanden. Zur Erklärung der zwischen Acetatverbrennung und CoA-Gehalt bestehenden Beziehung muß von der Annahme ausgegangen werden, daß die wirksame CoA-Form —

[1] Die folgenden Abkürzungen wurden benutzt: Coenzym A = CoA und CoASH, Coenzym-A-Derivate mit Disulfidbindung = CoASSR, Acetyl- bzw. Acyl-Coenzym A = $CoASCOCH_3$ bzw. CoASAc.

CoASAc — sich in der lebenden Zelle im Gleichgewicht mit ihren Vor- und Abbaustufen befindet. In diesem Gleichgewichtsprozeß läuft die Spaltung des Cofermentes als hydrolytischer Prozeß unter allen Umständen ab, während die Synthese bzw. Resynthese der Spaltprodukte an die energieliefernden Dissimilationsprozesse (z. B. Acetatverbrennung) in der Zelle geknüpft ist. Andererseits ist ein Mindestgehalt an CoA Voraussetzung für den Ablauf normaler dissimilatorischer Prozesse mit mehreren CoA-induzierten Reaktionsstufen. Diese Koppelung ist besonders für geschädigte Zellen folgenreich, indem eine verminderte Atmungsgröße zur Anhäufung vornehmlich inaktiver CoA-Verbindungen neben wenig aktivem CoA und dieser resultierende CoA-Mangel zur Störung im Stoffwechsel führen muß.

Zur Aufklärung dieser für den pathologischen Zellstoffwechsel bedeutenden Zusammenhänge sind nicht nur qualitative und quantitative Kenntnisse über den gesamten CoA-Gehalt, sondern auch über die mit dem aktiven CoA im Gleichgewicht stehenden CoA-Abkömmlinge von Interesse.

Verschiedene Untersucher haben multiple Formen des CoA in hochgereinigten CoA-Präparationen durch papierchromatographische Trennung nachgewiesen. Doch ist es nicht bekannt, welche CoA-Formen im biologischen Ausgangsmaterial vorliegen.

Die folgenden Untersuchungen haben deshalb zum Ziel:

1. Die schonende, für papierchromatographische Zwecke genügende Anreicherung (Acetonfraktionierung) der CoA-Verbindungen, die von der Zelle zur enzymatischen Acetylierung ausgenutzt werden können,

2. die papierchromatographische Trennung und Charakterisierung der Verbindungen und

3. die Bestimmung der mengenmäßigen Beziehungen dieser Komponenten zueinander.

Methodischer Teil

Für alle Untersuchungen wurden ausgewachsene Meerschweinchen (Gewicht etwa 300 g) verwendet. Die Nahrung der Tiere bestand aus einem kalorien- und vitaminreichen Mischfutter.

1. Herstellung des Kochsaftes aus Lebergewebe. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation nach vorausgegangenem Nackenschlag. Die Leber gelangte etwa 30 sec nach der Dekapitation in einen Mörser mit flüssiger Luft. Fein zerrieben wurden etwa 5 g Leber in einen mit 10 ml Wasser beschickten, vorgewogenen V2A-Stahlbecher gefüllt. Bei der Rückwägung ergab sich das Gewicht des zu analysierenden Lebergewebes. Das Analysengut wurde unter ständigem Rühren bis zum Sieden erhitzt, daraufhin unter fließendem Wasser abgekühlt und in ein vorbereitetes Eisbad gebracht. Dieser Erhitzungsprozeß benötigte etwa 60 sec. Eine unnötige Ausdehnung sollte vermieden werden. Alle weiteren Arbeitsgänge wurden bei Temperaturen zwischen —10° und +8° ausgeführt. Nun wurde 2 min homogenisiert (etwa 20000 U. p. min) und das denaturierte Eiweiß abzentrifugiert (15 min, 18000 × g).

Es können etwa $^2/_3$ des Ausgangsvolumens als Kochsaft gewonnen werden.

2. Anreicherung der CoA-Verbindungen durch Acetonfraktionierung aus Kochsaft. Die Anreicherung der Verbindungen wurde mittels des Acetylierungstestes von Kaplan und Lipmann kontrolliert.

Zur Prüfung der Acetonfällbarkeit der CoA-Derivate wurden 10 ml Kochsaft mit den aus Abb. 1 zu entnehmenden Volumen gekühlten Aceton stufenweise versetzt und sofort zentrifugiert (15 min, 18000 × g). Bis zur 4. Fraktion wurde der Bodenkörper einmal mit 2 ml des entsprechenden Aceton-Wasser-Gemisches gewaschen. Der so gewonnene Bodenkörper wurde jeweils mit Wasser auf 0,5 g aufgefüllt, gelöst und das Überstehende der nächsten Fraktionierungsstufe unterzogen (Acetonzusatz unter Berücksichtigung der Waschflüssigkeit). Nach der 12. Fraktionierung (12 ml Aceton/ml wäßriger Phase) wurde das Überstehende mit 5 ml 10%iger Quecksilber-acetat-Lösung versetzt, wobei ein Niederschlag ausfiel. Nach Abzentrifugieren wurde der Bodenkörper in 1 ml Wasser suspendiert (A), alles Quecksilber durch Einleiten von H_2S als Sulfid ausgefällt und erneut abzentrifugiert. Um das Flüssigkeitsvolumen nicht unnötig zu vergrößern, wurde auf das Waschen des Bodenkörpers verzichtet. A wurde zur Bestimmung des CoA-Gehaltes mit festem $NaHCO_3$ neutralisiert.

Das Fraktionierverfahren für papierchromatographische Zwecke wurde insoweit vereinfacht, als die Fraktion I (Fraktionsbezeichnungen vgl. Abb. 1) durch 1,5 ml Aceton/ml Kochsaft abgetrennt und mit 5 ml 60%igem wäßrigen Aceton (V/V) gewaschen wurde. Die Fraktionen II und III wurden aus den vereinigten Flüssigkeiten mit 10,5 ml Aceton/ml wäßriger Phase ausgefällt. Die Fraktion I bestand aus einem rötlichen voluminösen Bodenkörper, Fraktion II/III war eine durch Flavinderivate gelbbraun gefärbte ölige Flüssigkeit von etwa 10 mg/ml Kochsaft. Sie wurde mit Wasser auf 0,5 g aufgefüllt (zu diesem Zwecke erfolgte die Fraktionierung in vorgewogenen V2A-Stahlbechern). Diese Lösung wurde papierchromatographisch und im enzymatischen Acetylierungstest nach Kaplan u. Lipmann und Lynen u. Mitarb. weiter untersucht. In der Regel wurde nur die auf diesem Wege erzielte 7—10fache CoA-Anreicherung für die folgenden Untersuchungen verwendet, gelegentlich eine 20fache.

3. Enzymatische Methoden. Quantitative CoA-Bestimmung nach Kaplan u. Lipmann: Die quantitative Erfassung von CoA-Verbindungen und einigen Vorstufen (Pantethein, Pantetheinphosphat, Dephospho-CoA) gelingt durch Acetylierung von Sulfanilamid in Gegenwart von Adenosintriphosphat und einem Taubenleberenzymsystem. Zur Materialersparnis wurde die Modifikation von Lynen verwandt.

Ansatz in Zentrifugengläsern:

0,10 ml der auf CoA zu prüfenden Substanz, (bzw. 0,1 — × ml Wasser),

0,04 ml m/10 Glutathion-Lösung,

0,02 ml einer frisch bereiteten m $NaHCO_3$-Lösung,

0,10 ml Reaktionsgemisch (10 Teile 0,006 m Sulfanilamid-Lösung, 2,5-Teile m Na-acetat-Lösung, 10 Teile 0,05 m Na_4-Adenosintriphosphat-Lösung und 10 Teile 0,2 m Na-citrat-Lösung)

0,06 ml gealtertes Taubenleberfermentsystem (Darstellung nach Kaplan u. Lipmann).

Nach 2stündiger Inkubation bei 37° wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 5%iger Trichloressigsäure abgestoppt, denaturiertes Eiweiß abzentrifugiert und anschließend in 0,6 ml der klaren Lösung Sulfanilamid nach Bratton u. Marshall kolorimetrisch bestimmt. Die Standardisierung erfolgte mit einem 75%igen CoA-Präparat. Das verwendbare Meßbereich betrug 0,5—4 μg CoA.

Quantitative Bestimmung von $CoASCOCH_3$ nach Lynen u. Mitarb.: Dieser Bestimmungsmethode liegt die stöchiometrische Transacetylierung von $CoASCOCH_3$ auf Sulfanilamid zugrunde. In Abwesenheit von Adenosintriphosphat wird lediglich $CoASCOCH_3$ zur Transacetylierung ausgenutzt.

Ansatz in Zentrifugengläsern:

0,20 ml der auf $CoASCOCH_3$ zu prüfenden Lösung, bzw. 0,2 — × ml Wasser).
0,05 ml m/5 Pyrophosphatpuffer (8,92 g $Na_4P_2O_7 \cdot 10\,H_2O$ mit 8 ml n HCl und Wasser auf 100 ml),
0,02 ml 0,4 m Glutathion-Lösung,
0,032 ml 0,006 m Sulfanilamid-Lösung,
0,06 ml Enzymlösung.

Die Inkubation betrug 60 min bei 37°. Die Sulfanilamidbestimmung erfolgte nach Bratton u. Marshall. Als Enzymlösung diente eine nach Lynen u. Mitarb. gereinigte Proteinlösung aus Taubenleber. Das zur Prüfung der Methode erforderliche $CoASCOCH_3$ wurde nach Stadtman aus CoA und Essigsäureanhydrid dargestellt.

4. Papierchromatographisches Verfahren. Schleicher & Schüll-Papier 2043b 20×50 cm wurde 1 Std in eine 0,5%ige wäßrige Lösung von äthylendiamintetraessigsaurem Natrium (p_H 8,5) eingelegt und anschließend mehrfach in Wasser gewaschen. Durch diese Behandlung wurde der Gehalt an Ionen, die Nachweismethoden stören oder in ihrer Empfindlichkeit beeinträchtigen können, sehr reduziert.

Das eisgekühlte Analysengut (50—150 μl) wurde mit Mikropipetten in Portionen von 10 μl auf der Startlinie in einer Breite von 12—15 mm aufgetragen und im kalten Luftstrom getrocknet.

Für die 1. Dimension wurde folgendes Lösungsmittel benutzt:

40 Teile m/5 Acetatpuffer p_H 3,6 nach Walpole (Lösung A: 12,0 ml Eisessig und Wasser auf 1000 ml, Lösung B: 27,2 g Na-acetat $\cdot 3H_2O$ und Wasser auf 1000 ml, 18,5 Teile A und 1,5 Teile B)
10 Teile Isoamylalkohol
75 Teile Aceton.

Die in der absteigenden Durchlauftechnik vorgenommene Chromatographie dauerte 24—30 Std bei Zimmertemperatur.

Nach Trocknung der Papiere wurde das 2. Lösungsmittel zur Anwendung gebracht:

50 Teile Methylalkohol
50 Teile Acetatpuffer (Lösung A: 12 ml Eisessig und Wasser auf 1000 ml Lösung B: 13,6 g Na-acetat $\cdot 3H_2O$ und Wasser auf 1000 ml, 1 Teil A und 1 Teil B).

Zur Entwicklung wurden die Papiere in Streifen geschnitten, an 40×50 cm große Papierbögen schmalkantig angenäht, zu einem Zylinder gerollt und in das Lösungsmittelgemisch gestellt. Entwicklungszeit 14 Std bei Zimmertemperatur.

Lokalisation der bei 260 mμ absorbierenden Flecke im UV-Licht: Zur Anwendung gelangte eine Quecksilberniederdruckröhre mit maximaler Strahlung bei 254 mμ. Für die Photographie wurde Agfa-Copex-Papier benutzt.

Entwicklung der P-haltigen Flecke nach Hanes u. Isherwood: Die Papiere wurden mit Molybdat-Reagens (25 ml 4%iger Ammoniummolybdatlösung, 5 ml 60%iger Perchlorsäure, 10 ml n HCl und Wasser auf 100 ml) besprüht und in feuchtem Zustand 7 min einer Temperatur von 85° zur Spaltung der Ester ausgesetzt. Nach kurzer Behandlung mit Wasserdampf und H_2S erschienen P-haltige Stellen als blaue Flecke.

Nachweis des Sulfid-Schwefels (im wesentlichen nach Toennies und Kolb): Reagens I: 1,5 g Na-Nitroprussid gelöst in 5 ml 2 n H_2SO_4 + 95 ml Methanol + 10 ml 25%iges Ammoniak, filtrieren und in der Kälte aufbewahren. Reagens II: 2 g KCN gelöst in 5 ml Wasser + 95 ml Methanol. Reagens III: 3 g NaOH gelöst in 10 ml Wasser + 50 ml Methanol. Sulfhydrylgruppen wurden durch Eintauchen in das Reagens I nachgewiesen. Es entwickelten sich im Laufe von Sekunden rötliche Flecke. CN-spaltbare Schwefelverbindungen wurden nacheinander mit dem Reagens I und II behandelt. Abhängig von der Leichtigkeit der Spaltung trat die Färbung sofort oder bis zu Stunden verzögert auf. Die Färbung der Sulfhydrylgruppen wurde durch Reagens II verstärkt. Durch das Reagens III wurden Acylmercaptane gespalten.

Nachweis unsubstitutierter Glykolgruppierungen nach Buchanan, Dekker und Long: Das Chromatogramm wurde 5 min bei 80° getrocknet, anschließend mit 1%igem wäßrigen $NaJO_4$ besprüht und 10 min lang bei Zimmertemperatur gehalten. Sodann wurde das Papier SO_2 (Na_2SO_3 und H_2SO_4) ausgesetzt, bis das freigewordene Jod verbraucht war. Schließlich wurde das Papier mit Schiffs-Reagens besprüht (1 g Rosanilin in 50 ml Wasser mit SO_2 entfärbt und auf 1000 ml aufgefüllt) und 10 min auf 85° erhitzt. Die violetten Flecke wurden nach 10—20 Std deutlich.

Ergebnisse und Besprechung

Anreicherung der CoA-Verbindungen aus Meerschweinchenleber. Für die Abtrennung CoA-aktiver Fraktionen aus Leber war eine quantitative Bestimmungsmethode erforderlich, deren Spezifität sich auf CoA, sowie die von der Leber leicht ausnutzbaren Vorstufen erstreckt. Zu diesem Zwecke wurde die enzymatische Acetylierung von Sulfanilamid nach Kaplan und Lipmann verwendet. Dabei dient eine acetongefällte und gealterte Proteinfraktion aus Taubenleber, Adenosintriphosphat, Glutathion oder Cystein und Sulfanilamid als Enzymansatz. Mittels dieser Testmethode war es möglich, eine CoA-angereicherte Leberfraktion abzutrennen, die sich für eine papierchromatographische Untersuchung eignete.

Als Ausgangsmaterial für die Anreicherung wurde ein Kochsaft aus Lebergewebe benutzt. Wie der Verlauf der Untersuchungen zeigte, tritt durch das kurzfristige Erhitzen des Gewebes bei der Herstellung des Kochsaftes keine wesentliche Veränderung der CoA-Zusammensetzung ein.

Als Anreicherungsverfahren aus Kochsaft eignen sich für diese Zwecke kaum Schwermetallsalzfällungen. Mehrere Gründe sprechen dagegen. Nach allen bisherigen Erfahrungen liegt ein Teil des CoA als Acylmercaptan vor. Diese Verbindungsklasse zeigt jedoch eine große Empfindlichkeit gegen das in Frage kommende Quecksilber. Wie Sachs gefunden hat und Lynen u. Mitarb. an einer weiteren Anzahl Acylmercaptane bestätigen konnte, zerfallen diese Verbindungen beim Versetzen mit einer Lösung von Quecksilber-Acetat in die Carbonsäure und das Mercaptan, das sich als Quecksilbersalz niederschlägt. Verwendet man andererseits Barium-Acetat oder Silber-Nitrat — bei entsprechendem p_H — zur

Fällung der CoA-Verbindungen, dann wird die Ausbeute durch die zwar geringe, bei den vorliegenden Mengen aber bemerkenswerte Löslichkeit der Salze und die Adsorption an den Niederschlag bei der Entfernung des überschüssigen Fällungsmittels gestört. Deshalb wurde eine Fraktionierung des Kochsaftes mit Aceton versucht. Die Resultate zeigt die Abb. 1. Es lassen sich 4 Fraktionen mit CoA-Aktivität fällen, von denen

Abb. 1. Acetonfraktionierung des Kochsaftes aus Meerschweinchenleber

I und IV scharf von II und III getrennt sind. Die Mengen von I und IV überschreiten auf CoA bezogen selten 5%. Sie wurden deshalb bei der chromatographischen Trennung wegen ihres mengenmäßig geringen Anteils am Gesamt-CoA vernachlässigt.

Wird die Acetonfraktionierung unmittelbar am Lebergewebe vorgenommen, in dem das in flüssiger Luft grob zerkleinerte Gewebe mit Aceton homogenisiert und dann fraktioniert wurde, so zeigten sich keine realen Differenzen zur Kochsaftfraktionierung. Jedoch gelang uns das erforderliche Homogenisieren mit Aceton nicht ohne Volumenverluste, so daß zur quantitativen Beurteilung die Kochsaftfraktionierung beibehalten wurde.

Besonderes Interesse wurde Bilanzversuchen über die Ausbeute der Fraktionierung gewidmet. Im Vergleich mit der CoA-Aktivität im Kochsaft konnten 85,7% in den Fraktionen I—IV wiedergefunden werden. Wurde in Analogie zum Kochsaft die Acetonfraktionierung an dem hochgereinigten 75%igen CoA-Präparat der Firma C. H. Boehringer Sohn vorgenommen, so konnte die gesamte Aktivität in den Fraktionen I—III zurückgewonnen werden. Zur Erklärung dieser Differenz ist der Hinweis notwendig, daß die Acetylierung von Sulfanilamid nach Kaplan und Lipmann — wie schon vorher beschrieben wurde — eine sehr

komplexe Reaktion ist und nicht nur CoA selbst, sondern auch Teilstrukturen zu erfassen vermag (soweit sie durch das Taubenleberfermentsystem zu aktivem CoA umgewandelt werden können). Während die in hochgereinigten CoA-Präparationen vorliegenden CoA-Verbindungen (CoASH, CoASSR) sich durch Aceton quantitativ ausfällen lassen und unverändert aktiv sind, werden bei der Acetonfraktionierung des Kochsaftes Substanzen abgetrennt, die entweder 1. den Ausfall des Acetylierungstestes fördern oder 2. nur mit Teilstrukturen in den Fraktionen I—IV zu CoA-aktiven Verbindungen aufgebaut werden können. Das Vorliegen größerer Mengen CoA-Verbindungen mit guter Löslichkeit in Aceton konnte durch Zusatz von Quecksilber-Acetat zum Überstehenden der III. Fraktionierung ausgeschlossen werden. Die so gewonnene Fraktion IV besaß eine Restaktivität von nur wenigen Prozenten (Fraktion IV, Abb. 1).

Lynen u. Mitarb. gelang es, aus Hefe eine Verbindung mit den Eigenschaften eines $CoASCOCH_3$ anzureichern. Für die Bestimmung wurde ein modifizierter Acetylierungstest verwendet, in dem lediglich $CoASCOCH_3$ (stöchiometrisch) mit Sulfanilamid reagiert. Mit der gleichen Methode konnte in den Fraktionen II und III aus Leber $CoASCOCH_3$ nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind aus Tab. 2 zu ersehen. Auf

Tabelle 1. *Positionskonstanten, R_F-Werte und färberische Eigenschaften von 7 aus Meerschweinchenleber abgetrennten Komponenten*

Fraktion	1. Dimension P. const*	2. Dimension R_F	Nachweis					
			UV-Absorption bei 260 mμ	Phosphorsäureester (Hanes und Isherwood)	Sulfidschwefel Na-Nitroprussidreaktion			Glykolgruppierung
					— SH	Alkalispaltbar	KCN-spaltbar	
A_1	44	0,26	+	+	—	—	(+) nur bei stärkster Anreicherung	—
								—
A_2	80	0,46	+	+	—	—	+	—
A_3	74	0,58	+	+	—	+	+	—
B_1	144	0,57	+	+	—	—	+ verzögert	
B_2	176	0,57	+	+	—	—	+ verzögert	—
B_3	194	0,67	+	+	—	—	+	—
C	259	0,67	+	+	+	+	+	—

* P. const = $\frac{\text{Entfernung des Fleckes vom Startpunkt} \times 100}{\text{Entfernung von Adenosintriphosphat (Vergleichssubstanz) vom Startpunkt}}$

Frischgewebe berechnet konnte pro Gramm 0,5—1,2 μg „aktive Essigsäure" — entsprechend 9—24 μg $CoASCOCH_3$ — gefunden werden. Dieser hohe $CoASCOCH_3$-Gehalt konnte bei der folgenden Identifizierung der chromatographisch getrennten Komponenten bestätigt werden.

Papierchromatographische Trennung und Identifizierung. Die Acetonfraktionen II und III, die mehr als 95% der fällbaren CoA-Aktivität

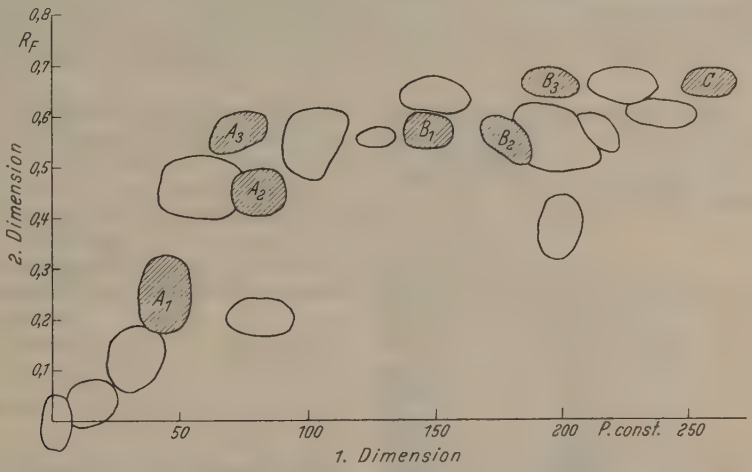


Abb. 2. Chromatogrammpause, aus der die Lage der aufgetrennten Komponenten nach 2-dimensionaler Entwicklung hervorgeht. Analysenlösung Fraktion II/III. Die quergestreiften Felder zeigen CoA-Wirksamkeit

enthalten, wurden einer papierchromatographischen Aufarbeitung unterzogen. Wesentliche Voraussetzung für das Gelingen der Trennung waren geeignete Lösungsmittelgemische. Zur Schonung der vor allem alkaliempfindlichen Acylmercaptane eigneten sich schwach saure Lösungsmittelgemische mit Aceton bzw. Methanol als organischer Phase.

Die Aufarbeitung in der 1. Dimension zeigte nach Art der Fleckbildung ungenügende Trennung. Die 2. Dimension ließ 7 CoA-aktive Komponenten erkennen, die auf Grund ihrer färberischen Eigenschaften und der Verteilung der Acetylierungsaktivität eine Einheitlichkeit wahrscheinlich machten. Die Positionskonstanten (bezogen auf Adenosintriphosphat[1] als Vergleichssubstanz) und die R_F-Werte sind aus Tab. 1 und Abb. 2 zu entnehmen. Für keine der 7 Komponenten ist eine künstliche Entstehung bei der papierchromatographischen Trennung in nennenswertem Umfange anzunehmen. Läßt man nämlich die nach dem 2. Lösungsmittel gefundenen Flecke erneut in beiden Lösungsmittelgemischen wandern, so ist kein sicheres Auftreten neuer Fraktionen zu

[1] Pabst Laboratories, Milwaukee, Wis.

beobachten. Ebenso waren keine wesentlich anderen Ergebnisse zu erzielen, wenn die Trocknung nach Auftropfen der Analysenlösung und die Wanderung in einer Stickstoff-Kohlensäure-Atmosphäre (95%/5%) vorgenommen wurde (Tab. 3, Nr. 11).

Entscheidender Hinweis für die Zugehörigkeit der Komponenten zur CoA-Klasse war der Acetylierungstest nach Kaplan und Lipmann.

Auf Grund der geringen CoA-Konzentrationen, die in den Papierflecken zu erwarten waren, wurden in der Regel die ausgeschnittenen Flecke unmittelbar dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Klein gewählte Stücke, die gänzlich von der Flüssigkeit des Ansatzes bedeckt waren, gewährleisteten die analytischen Bedingungen.

Tabelle 2. *Gesamt-CoA- und $CoASCOCH_3$-Gehalt in Meerschweinchenleber*

Versuchs-Nr.	Gesamtmenge der CoA-wirksamen Verbindungen*		$CoASCOCH_3$**	
	im Kochsaft	in Fraktion II/III	in Fraktion II/III	in Komponente A_3
	in µMol (bezogen auf 1 g Frischgewebe)		in µMol (bezogen auf 1 g Frischgewebe)	
1.	0,107	0,101	—	—
2.	0,147	0,126	—	—
3.	0,173	0,124	—	—
4.	0,186	0,160	—	—
5.	0,131	0,120	—	—
6.	0,125	0,128	—	—
7.	0,183	0,148	0,017	0,013
8.	0,105	0,071	0,011	0,006
9.	0,210	0,168	0,025	0,025
10.	0,186	0,121	0,012	0
11.	0,155	0,105	0,012	0,013
12.	0,095	0,082	0,030	0,015
Mittelwert	0,150	0,121	0,018	0,012

* Bestimmt nach Kaplan und Lipmann, berechnet auf CoASH.
** Bestimmt nach Lynen u. Mitarb.

Der Acetylierungstest läßt die chemische Natur der Verbindungen weitgehend offen. Es war deshalb von Interesse, die Übereinstimmung unserer Chromatogrammflecke mit CoASH oder CoA-verwandten Verbindungen zu prüfen.

Die funktionelle Wirkung des CoA ist an die SH-Gruppe gebunden. Ihr Nachweis gelingt mit der Na-nitroprussid-Reaktion von Toennies und Kolb. Beim positiven Ausfall zeigen sich rote Flecke auf dem Chromatogramm. CoASAc als Acylmercaptan gibt keine positive Na-nitroprussid-Reaktion für SH-Gruppen. Doch werden solche Verbindungen leicht in stark alkalischem Milieu hydrolysiert und reagieren daraufhin mit diesem Reagens. Auch Disulfidbindungen sind mit Na-nitroprussid erst nach Spaltung mit KCN nachweisbar.

Die Beurteilung der Chromatogramme auf ihren Schwefel-Gehalt und dessen Bindungsart aus dem Ergebnis der Reaktion von TOENNIES und KOLB bietet einige Schwierigkeiten durch die im Verhältnis zum Acetylierungstest geringe Empfindlichkeit. Dazu wird die Rotfärbung des positiven SH-Nachweises durch KCN (disulfidspaltendes Reagens) verstärkt. Liegt nun die CoASH-Konzentration etwas unterhalb der Nachweisgrenze, dann fällt die einfache Na-nitroprussid-Reaktion negativ aus. Die verstärkende Wirkung des KCN kann in diesem Fall das Vorliegen des Schwefels in der Disulfidform vortäuschen. Eine Identifizierung der Schwefelbindung im CoA auf dem Chromatogramm gelingt nur in verhältnismäßig stark angereicherten Fraktionen.

Die Ergebnisse des Schwefelnachweises sind aus Tab. 1 zu ersehen. Lediglich die schwache Komponente C zeichnet sich durch freie SH-Gruppen aus. Die Fraktion A_3 reagiert in der Art von Acylmercaptanen. Alle übrigen Flecke zeigen eine Reaktionsweise, die den Disulfiden entspricht. Bemerkenswert ist, daß die Komponenten B_1 und B_2 sich nach Na-nitroprussid- und KCN-Behandlung nur sehr verzögert rot färben.

CoA trägt in 3′-Stellung einen Phosphorsäurerest. Er wird als letzter Schritt der Biosynthese des CoA durch Adenosintriphosphat in 3′-Dephospho-CoA eingefügt. Nucleoside und Nucleotide, die in Position 2′ und 3′ unsubstituiert sind, werden nun durch Perjodat zu Dialdehyden oxydiert, was auf dem Chromatogramm durch Sprühen mit

Tabelle 3. *CoA*-Gehalt in 7 chromatographisch getrennten Komponenten aus Meerschweinchenleber*

Versuchs-Nr.	In μMol (bezogen auf CoASH und 1 g Frischgewebe) (in Klammern prozentualer Anteil des CoA-Gehaltes in der aufgetragenen Analysenlösung (Fraktion II/III)							Insgesamt wiedergefunden
	A_1	A_2	A_3	B_1	B_2	B_3	C	
7.	0,015 (10,3)	0,025 (16,5)	0,012 (7,8)	0,014 (9,4)	0,035 (23,5)	0,001 (0,5)	0	0,101 (68,0)
8.	0,003 (3,8)	0,008 (11,0)	0,013 (18,4)	0,007 (9,2)	0,017 (23,9)	0,018 (25,7)	0	0,065 (92,0)
9.	0	0,008 (4,8)	0,032 (18,9)	0,041 (24,3)	0,058 (34,4)	0,007 (4,2)	0,004 (2,4)	0,150 (89,0)
10.	0	0,018 (14,8)	0,006 (5,0)	0,031 (25,5)	0,058 (47,8)	0,001 (0,8)	0,011 (9,1)	0,125 (103,0)
11.	0,002 (1,9)	0,007 (6,7)	0,020 (18,9)	0,022 (20,9)	0,018 (17,1)	0,004 (3,8)	0,007 (6,7)	0,080 (76,0)
12.	0,004 (4,9)	0,003 (3,7)	0,018 (21,8)	0,020 (24,0)	0,029 (35,0)	0,009 (11,0)	0,002 (2,4)	0,085 (103,0)
Mittelwert	(3,5)	(9,6)	(15,1)	(18,9)	(30,3)	(7,7)	(3,4)	(88,5)

* Bestimmt im Acetylierungstest nach KAPLAN und LIPMANN.

Schiffs-Reagens nachgewiesen werden kann. CoA mit seinem Phosphorsäurerest in 3′-Stellung gibt keine Farbreaktion. Bei Anwendung dieses Verfahrens auf die 7 Komponenten aus Meerschweinchenleber läßt sich nicht sicher eine CoA-aktive Verbindung nachweisen, die in 2′- und 3′-Stellung unsubstituiert ist (Tab. 1).

Das empfindliche Verfahren von Hanes und Isherwood kennzeichnet den Phosphorgehalt der Fraktionen. Ihre Adeninkomponente

Abb. 3. Ausschnitt aus einer UV-Photographie nach 2-dimensionaler Entwicklung. Analysenlösung Fraktion II

gibt sich bei der Photographie im UV-Licht bei 260 mμ zu erkennen (Tab. 1).

Nach der Vorreinigung des Leberkochsaftes durch Acetonfällung fand sich in den Fraktionen II und III eine beachtliche $CoASCOCH_3$-Konzentration. Ihrer Identifizierung sind die folgenden Untersuchungen bestimmt. Wir schlossen uns im wesentlichen der von Lynen u. Mitarb. angegebenen Beweisführung für die Acetylmercaptanform des CoA in Hefe an.

Das Ergebnis der stöchiometrischen Acetylierung von Sulfanilamid nach Lynen u. Mitarb. lenkte die Aufmerksamkeit auf die Komponente A_3 (Tab. 2).

Beim quantitativen Vergleich der Aktivität im Acetongefällten und in der papierchromatographisch abgetrennten Komponente fällt eine deutliche Differenz auf. Sie läßt sich sowohl mit der Fehlerbreite des Untersuchungsverfahrens als auch

dem Vorliegen weiterer unter der Empfindlichkeitsgrenze liegender Acetylformen des CoA auf dem Papierchromatogramm deuten. Wir möchten uns beiden Gründen anschließen.

In guter Übereinstimmung mit dem stöchiometrischen Acetylierungstest ist die Na-nitroprussid-Reaktion. Erst nach Behandlung mit alkoholischer NaOH-Lösung zeigte sich Rotfärbung. Als weitere charakteristische Eigenschaft der Acylmercaptane prüften wir die Spaltbarkeit durch Quecksilber. Wenn die Acetonfraktion II/III vor dem Auftropfen mit Quecksilber-Acetat versetzt, zentrifugiert und das in Wasser aufgenommene Präcipitat mit H_2S behandelt wurde, so fehlte die Komponente A_3 auf dem Chromatogramm. Die Übereinstimmung mit $CoASCOCH_3$ und Differenzierung von CoASH läßt sich weiterhin durch die fehlende Oxydierbarkeit mit Jod belegen. Wird die Acetonfraktion II/III mit alkoholischer Jodlösung versetzt, dann werden freie Mercaptane zu Disulfiden oxydiert. Nach der papierchromatographischen Trennung zeigte sich, daß die Komponente A_3 durch Jod nicht verändert worden war.

Für die Auftrennung der beschriebenen 7 Komponenten wurden die Acetonfraktionen II und III verwendet. Wurde lediglich die Fraktion II chromatographiert, so konnte besonders gut der Fleck A_3 erhalten werden (Abb. 3). Allerdings war damit ein Aktivitätsverlust verbunden.

Die wirksame Sulfhydrylform des CoA kann durch Oxydation in eine Disulfidbindung überführt werden. Dann ist das Coenzym katalytisch unwirksam. Diese inaktive Form, deren Disulfidkomponente verschiedener Natur ist, kann in der lebenden Zelle leicht wieder aktiviert werden. Wahrscheinlich übernimmt Glutathion oder ein spezifisches Enzym dort diese Rolle. Die Acetylform des CoA, das funktionell wichtigste Acylderivat des CoA, kann im tierischen Organismus unmittelbar enzymatisch aus Acetat und ATP, aus Brenztraubensäure oder möglicherweise durch Dehydrierung eines Halbmercaptals gebildet werden. CoASH, $CoASCOCH_3$ und CoASSR stehen in enger Beziehung, die durch das folgende Schema gekennzeichnet werden kann:

$$\text{CoASSR} \leftrightharpoons \text{CoASH} \leftrightharpoons \text{CoASCOCH}_3$$
$$\Updownarrow$$
$$\text{3'-Dephospho-CoASH}$$

Ihr Auftreten konnte mit dem beschriebenen Verfahren in der Leber von Meerschweinchen beobachtet werden. Das Mengenverhältnis der Verbindungen zueinander beträgt = 23:5:1 ($CoASSR : CoASCOCH_3 : CoASH$). Das in diesem Schema ebenfalls eingetragene 3'-Dephospho-CoASH, das als letzte Stufe auf dem biosynthetischen Wege durchlaufen wird, konnte nicht nachgewiesen werden. Da die Verbindung im Acetylierungstest zu CoASH phosphoryliert und somit enzymatisch aktiv wird, so kann sie lediglich unter 1% des gesamten CoA betragen. (Dieser Grenzwert ergibt sich aus der Empfindlichkeit des Acetylierungstestes.)

Die multiplen Formen in hochgereinigten, bis zu 80% enthaltenden CoA-Präparationen aus Hefe und Streptomyces fradiae (De Vries u. Mitarb., Gregory u. Mitarb., Beinert u. Mitarb. und Buyske u. Mitarb.), die durch teilweise nicht indifferente Arbeitsgänge gewonnen wurden (Fällung als Schwermetallsalze, Eluierung mit Pyridin-Wasser, Reduktion u. a.), enthalten vornehmlich CoA mit freier Sulfhydrylgruppe neben Disulfidformen. Nachweisbare Mengen $CoASCOCH_3$ erkannte Lynen in Hefe. Von Basford und Huennekens wird auf Grund färberischer Eigenschaften bei der Papierchromatographie eine Thiazolin-Struktur des CoA diskutiert. Dieselben Untersucher fanden in einem hochgereinigten CoA-Präparat 4 Komponenten mit Sulfhydryl- und Disulfideigenschaften im Verhältnis 79 : 21 (bezogen auf die Aktivität im Acetylierungstest).

Unsere Untersuchungen lassen erkennen, daß die Verteilung in diesen Präparationen keinen Vergleich mit den Verhältnissen in der Meerschweinchenleber zuläßt.

Die Charakterisierung der sogenannten Disulfidverbindungen des CoA, die mengenmäßig bedeutenden Anteil besitzen und in unseren Versuchen in 5 Fraktionen (bei Vernachlässigung der Aceton-Fraktionen I und IV) anzutreffen sind, stützt sich bislang fast ausschließlich auf die KCN-Spaltbarkeit im Na-nitroprussid-Test. Jedoch lassen die recht unterschiedliche Spaltungsdauer und die Erfahrungen von Basford und Huennekens an verwandten Fraktionen aus Hefe mit Indophenol vermuten, daß sich hinter den KCN-spaltbaren Komponenten neben Disulfidformen andere schwerer spaltbare Schwefelverbindungen verbergen.

CoA, 75%ig, wurde freundlicherweise von der Firma C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim am Rhein, und Glutathion von der Firma Deutsche Hoffmann-La Roche A.G., Grenzach (Baden), zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassung

1. Durch schonende Acetonfraktionierung und papierchromatographische Trennung lassen sich aus dem Kochsaft von Meerschweinchenleber 7 Komponenten darstellen, die Coenzym-A-Wirksamkeit zeigen.

2. Durch Analyse der Papierflecke lassen sich neben Coenzym A mit freien SH-Gruppen, Acetyl-Coenzym A und 5 Verbindungen mit KCN-spaltbaren Schwefelbindungen im Verhältnis 1 : 5 : 23 (Coenzym A-SH : Coenzym A-$SCOCH_3$: Coenzym A-SSR) nachweisen.

3. Das auf dem biosynthetischen Wege des Coenzyms A als letzte Stufe auftretende 3′-Dephospho-Coenzym A — nachweisbar über seine freie Glykolgruppierung — konnte nicht gefunden werden. Seine Konzentration muß unter 1% des gesamten Coenzyms A liegen.

4. Die beschriebene Arbeitsweise bietet die Möglichkeit, wesentliche Coenzym-A-Derivate in analytische Studien einzubeziehen.

Literatur

Basford, R. E., and F. M. Huennekens: J. Amer. Chem. Soc. **77**, 3878 (1955). — Beinert, H., R. W. v. Korff, D. E. Green, D. A. Buyske, R. E. Handschumacher, H. Higgins and F. M. Strong: J. of Biol. Chem. **200**, 385 (1953). —

Bratton, A. C., and E. K. Marshall: J. of Biol. Chem. **127**, 537 (1939). — Buchanan, J. G., C. A. Dekker and A. G. Long: J. Chem. Soc. (Lond.) **1950**, 3162. — Buyske, D. M., R. E. Handschumacher, H. Higgins, T. E. King, F. M. Strong, V. H. Cheldelin, L. J. Teply and G. C. Mueller: J. of Biol. Chem. **193**, 307 (1951). — Feldberg, W., and T. Mann: J. of Physiol. **104**, 411 (1946). — Gregory, J. D., G. D. Novelli and F. Lipmann: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 854 (1952). — Hanes, C. S., and F. A. Isherwood: Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949). — Kaplan, N. O., and F. Lipmann: J. of Biol. Chem. **174**, 37 (1948). — Lipmann, F.: J. of Biol. Chem. **160**, 173 (1945). — Lipmann, F., N. O. Kaplan, G. D. Novelli, L. C. Tuttle and B. M. Guirard: J. of Biol. Chem. **186**, 235 (1950). — Lipton, M. A., and E. S. G. Barron: J. of Biol. Chem. **166**, 367 (1946). — Lynen, F., E. Reichert u. L. Rueff: Liebigs Ann. **574**, 1 (1951). — Nachmansohn, D., and M. Berman: J. of Biol. Chem. **165**, 551 (1946). — Novelli, G. D., N. O. Kaplan and F. Lipmann: Federat. Proc. **9**, 209 (1950). — Novelli, G. D., and F. Lipmann: J. of Biol. Chem. **182**, 213 (1950). — Sachs, G.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. **54**, 1849 (1921). — Snell, E. E., G. M. Brown, V. J. Peters, J. A. Craig, E. L. Wittle, J. A. Moore, V. M. McGlohon and C. D. Bird: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 5349 (1950). — Stadtman, E. R., aus G. D. Novelli: Methods of Biochemical Analysis **2**, 189 (1955). — Toennies, G., and J. I. Kolb: Analyt. Chemistry **23**, 823 (1951).

Dr. Fred Leuschner, Erlangen, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 302—306 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Pharmakologische Differenzierung des Eiklar- und Dextranödems der Ratte*

Von
MARTIN KRAMER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Dezember 1955)

I

Ödemreaktionen von Ratten nach Eiereiweiß und Dextran werden seit längerer Zeit in großem Umfang zur Auswertung antiphlogistisch wirksamer Pharmaka benutzt. Die ödemerzeugenden Substanzen werden dabei intraperitoneal gespritzt und der Verlauf der sich an den Pfoten und der Schnauze entwickelnden Ödeme beobachtet (HALPERN u. BRIOT, MORRISON u. a., KITCHIN u, a., KRAMER u. a.). Die zweite Methode der lokalen Applikation in den Pfotenrücken bietet — allerdings nur am narkotisierten Tier — den Vorteil der quantitativen Meßbarkeit der Ödemintensität und damit die Möglichkeit der statistischen Auswertung (WILHELMI u. DOMENJOZ, GROSS, HAAS u. a., HILLEBRECHT, HEITE u. a.). Bei der ausgedehnten Anwendung dieser Teste und unseren geringen Kenntnissen über den Mechanismus der Entzündungshemmung erscheint es wünschenswert, über die Pathogenese dieser Ödeme näheres zu erfahren. Versuche zu diesem Zweck wurden schon mehrfach angestellt (EICHENBERGER, SCHMIDTHAUSER u. RUFENER, BRIOT u. HALPERN, F. HAHN, A. LANGE u. H. GIERTZ), ohne daß man dem eigentlichen Entstehungsmechanismus wesentlich näher gekommen wäre.

Bei eigenen Prüfungen entzündungshemmender Pharmaka fiel auf, daß einige der untersuchten Substanzen nur das Eiklarödem und nicht das Dextranödem beeinflußten. Dieser Befund war Anlaß einer ausgedehnteren Untersuchung mit dem Ziel, das Vorhandensein eindeutig qualitativer Unterschiede in der Beeinflußbarkeit der beiden Ödemarten nachzuweisen.

II

Zur Auslösung von Ödemen wurden Ratten 300 mg/kg Dextran (Macrodex oder Dextran der Firma Benger Ldt. Mol. Gew. 50000) oder 5 ml/kg frisches Eiereiweiß intraperitoneal injiziert und die Intensität der 1—2 Std danach auftretenden Ödeme alle 60 min in 3 Graden geschätzt. Von jedem Tier wurde nach dem Verfahren

* Ein Teil der Ergebnisse wurde auf der 21. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Saarbrücken vorgetragen.

von Eichenberger, Schmidthauser u. Rufener eine Ödemzahl durch Addition der geschätzten Ödemgrade pro Stunde ermittelt. Die zu prüfende Substanz wurde jeweils 30 min vor der Eiklar- oder Dextranapplikation i. m. oder i. p. injiziert.

Von den zahlreichen untersuchten Substanzen sind einige Beispiele in Abb. 1 graphisch dargestellt. Die Ödemintensität der vorbehandelten Tiere ist in Prozenten des Ödemgrades der Kontrolltiere angegeben. Durch 200 mg/kg Aminophenazon, eine Dosis, bei der fast alle Tiere

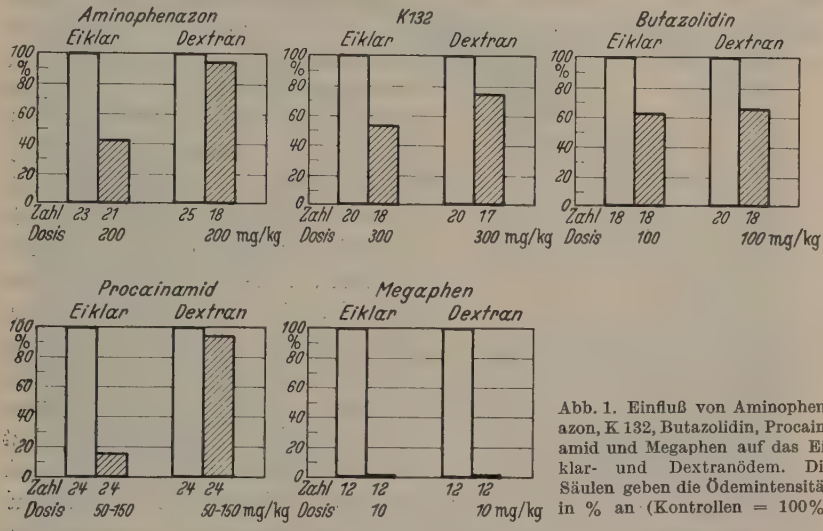


Abb. 1. Einfluß von Aminophenazon, K 132, Butazolidin, Procainamid und Megaphen auf das Eiklar- und Dextranödem. Die Säulen geben die Ödemintensität in % an (Kontrollen = 100%)

Krämpfe bekamen und einige starben, wurde das Eiklarödem um 57% gehemmt, während das Dextranödem nicht beeinflußt wurde. Noch deutlicher war der Unterschied beim Procainamid. Durch 50—150 mg/kg wurde das Eiklarödem um 88% gehemmt, während das Dextranödem wieder nicht beeinflußt wurde. Die Hemmung des Eiklarödems war bei 50, 100 und 150 mg/kg ungefähr gleich. Beim Dextranödem waren alle 3 Dosen wirkungslos. Deswegen wurden die 3 Versuchsreihen zusammengefaßt. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Morrison, Richardson u. Bloom, die mit Procainamid das Dextranödem an 10 Tieren um 50% hemmen konnten. Bei den anderen Substanzen wurde auch das Dextranödem beeinflußt. Das 1,2-Diphenyl-3,5-dioxo-4 butylpyrazolidin (Butazolidin) und das Diaethylaminoäthanolsalz des 1,4-Diphenyl-3,5-dioxypyrazolidins (K 132) werden als Lösungsvermittler für Aminophenazon benutzt und haben selbst antiphlogistische Eigenschaften (Domenjoz, Haas u. Kraft). Die hier angewandten Dosen (300 mg/kg K 132 und 100 mg/kg Butazolidin) haben ungefähr die gleiche Toxicität. Von den 20 Tieren starben je 2. Beide Verbindungen waren fast gleich wirksam, nur mit dem Unterschied, daß K 132 etwas

mehr das Eiklarödem und etwas weniger das Dextranödem beeinflußte. Durch 10 mg/kg Dimethylaminopropyl-3-Chlor-Phenothiazin (Megaphen) wurden beide Ödemarten vollständig gehemmt.

III

Die gefundenen Unterschiede in der pharmakologischen Beeinflußbarkeit können auf einem verschiedenen Entstehungsmechanismus der beiden Ödemarten beruhen und ferner durch die Menge des injizierten Phlogisticums bedingt sein (Domenjoz). Die letztgenannte Möglichkeit des verschiedenen Verhaltens aus rein quantitativen Ursachen mußte zunächst durch weitere Versuche ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurde eine Dextrandosis ermittelt, die der Wirkung von 0,5 ml/kg Eiklar ungefähr äquivalent war. Als Kriterium wurde die Prozentzahl der mit Ödemen reagierenden Tiere gewählt. Diese beträgt beim Eiklarödem 85—90% (Eichenberger u. Mitarb., Kramer). In einer Vortestung wurden je 10 Tieren verschiedene Dextrandosen gespritzt und die Zahl der Ödemtiere nach 2 Std registriert. Das Ergebnis zeigt Tab. 2. Mit den Dosen 100 und 120 mg/kg wurde eine größere Zahl von Versuchen unternommen. Bei 120 mg/kg bekamen von 100 Tieren 84 Ödeme, bei 100 mg/kg bekamen von 50 Tieren 40 Ödeme. Nach diesem Ergebnis wurde die Dosis von 120 mg/kg Dextran der benutzten Eiklardosis als wirkungsgleich angesehen. Bei dieser Dosis bekamen von 30 Tieren, die mit 150 mg/kg Procainamid vorbehandelt waren, 26 Tiere Ödeme von gleicher Intensität und Dauer wie nicht vorbehandelte Tiere. 200 mg/kg Aminophenazon hemmten bei dieser Dextrandosis das Ödem deutlich. Bei 23 Tieren betrug die Ödemzahl 58% von der der Kontrollen. Damit war erwiesen, daß die injizierte Dextranmenge für die Procainamidwirkung keine Bedeutung hat. Die verschiedene Beeinflußbarkeit des Dextran- und Eiklarödems kann demnach nur mit der Annahme erklärt werden, daß die beiden Ödemarten einen verschiedenen Entstehungsmechanismus und die Antiphlogistica verschiedene Angriffspunkte besitzen.

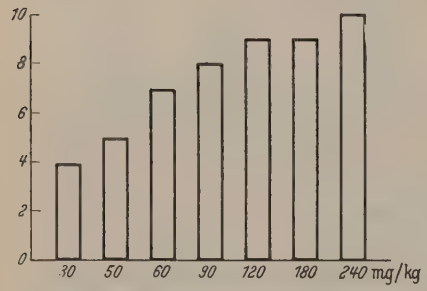


Abb. 2. Zahl der mit Ödemen reagierenden Tiere bei verschiedenen Dextrandosen (10 Tiere in jeder Gruppe)

IV

Das N-(3'-)Dimethylaminopropyl-3-chlor-phenothiazin (Megaphen) hat eine besonders intensive antiphlogistische Wirkung auf beide Ödemarten und ist durch besonders starke Wirkungen auf das Zentralnervensystem

ausgezeichnet. Um die Bedeutung dieses zentralen Angriffspunktes für die Ödemhemmung zu studieren, wurde versucht, an dezerebrierten Ratten mit Dextran Ödeme auszulösen. Dies gelang bei 3 von 30 Tieren, bei denen die Ödeme jedoch später auftraten als normalerweise. Die übrigen Tiere starben wenige Stunden nach der Dextraninjektion. Die Versuche zeigen, daß die Ödementwicklung ohne Groß -und Mittelhirn

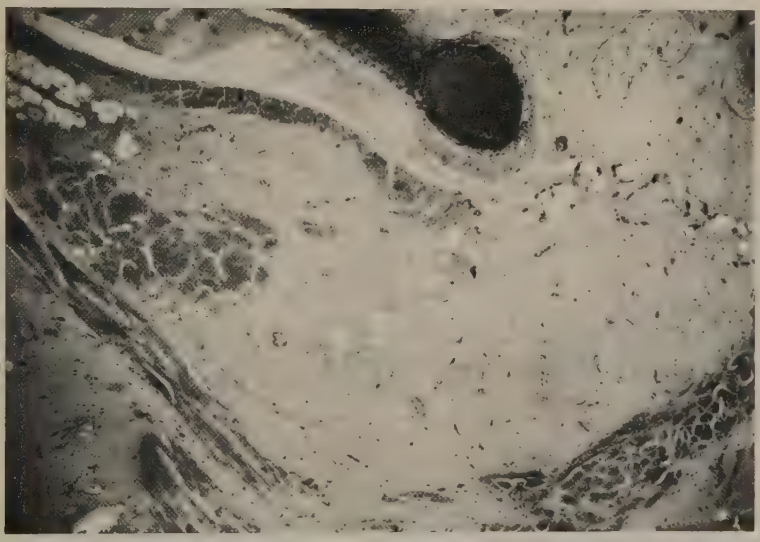


Abb. 3. Dextranödem der Rattenschnauze. Der histologische Schnitt (H.-E.-Färbung, Vergrößerung des Films 330 X) zeigt ein hochgradiges Ödem der Wange, durch das Muskulatur und Bindegewebe weit auseinandergedrängt sind. In der Haarscheide sind Blutungen zu beobachten

grundsätzlich möglich ist. Wegen der geringen Zahl positiver Reaktionen ist diese Versuchsanordnung zum Studium etwaiger zentraler Angriffspunkte ödemhemmender Pharmaka ungeeignet.

V

Bei der ausgedehnten Anwendung der Ödemreaktion als Modellversuche einer experimentellen „Entzündung" erhebt sich die Frage, ob die Kriterien, die der Pathologe für die Definition des Begriffes „Entzündung" fordert, hierbei gegeben sind. Wenn man z. B. auch mit Propylenglykol (Kitchin et al., eigene Untersuchungen) die Entwicklung des Dextranödems abschwächen oder aufheben kann, so wird man daraus nicht ohne weiteres schließen können, daß Propylenglykol für die Therapie einer entzündlichen Erkrankung wie der Polyarthritis ein brauchbares Antiphlogisticum ist.

Die histologischen Untersuchungen von Ödemen der Schnauze und Pfoten nach Dextran, die Herr Prof. Rössle freundlicherweise

vorgenommen hat, ergaben ein hochgradiges, aber zellfreies Ödem, das seine Quelle so erdrückt hatte, daß man die zweifellos vorher hyperämisierten Gefäße nicht mehr entsprechend blutgefüllt im histologischen Präparat sieht (Abb. 3). Daß eine Läsion der Capillaren vorhanden gewesen sein mußte, ergab sich aus den Blutungen, die sich in den Scheiden der Haare und ihrer Drüsen entwickelt haben. Außer dem Fehlen zelliger Infiltration, war das Fehlen von Gerinnungsvorgängen bemerkenswert. Beides erklärt die Flüchtigkeit der Dextranwirkung. Man könnte diese Reaktion als Grenzfall einer rein serösen Entzündung auffassen.

Zusammenfassung

1. Durch Procainamid kann nur das Eiklarödem, nicht das Dextranödem gehemmt werden. Dieser Unterschied beider Ödemarten ist qualitativer Art.

2. Auch an decerebrierten Ratten löst Dextran Ödeme aus, so daß das Zentralnervensystem für die Ödementstehung offenbar keine entscheidende Bedeutung hat.

3. Die histologische Untersuchung von Dextranödemen ergab ein hochgradiges Ödem bei völligem Fehlen von zelliger Infiltration und von Gerinnungsvorgängen.

Literatur

Bludau, W., u. H. J. Heite: Arzneimittel-Forsch. **4**, 639 (1954). — Briot, M., et B. N. Halpern: C.r. Soc. Biol. (Paris) **146**, 15 (1952). — Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 14 (1955). — Diskussionsbemerkung z. Vortrag Kramer. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 84 (1955). — Eichenberger, E., M. Schmidthauser u. G. Rufener: Helvet. physiol. Acta **10**, 505 (1952). — Gross, E.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 421 (1950). — Haas, H., u. H. Kraft: Arzneimittel-Forsch. **4**, 249 (1954). — Haas, H., E. Hohagen u. G. Kollmannsperger: Arzneimittel-Forsch. **3**, 238 (1953). — Hahn, F.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, 24 (1954). — Naturwissenschaften **41**, 465 (1954). — Hahn, F., A. Lange u. H. Giertz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 603 (1954). — Halpern, B. N., M. Briot et Th. Neveu: C.r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 308 (1954). — Halpern, B. N., e. M. Briot: Arch. internat. Pharmacodynamie **82**, 247 (1950); **91**, 291 (1952). — Hillebrecht, J.: Arzneimittel-Forsch. **4**, 607 (1954). — Kitchin, H. W., W. Y. Smith, G. L. Wallace jr., M. Perkins and J. L. Morrison: Arch. internat. Pharmacodynamie **99**, 17 (1954). — Kramer, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 391 (1953). — Morrison, J. L., A. P. Richardson and W. L. Bloom: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 98 (1951). — Wilhelmi, G., u. R. Domenjoz: Arzneimittel-Forsch. **1**, 131 (1951).

Dr. Martin Kramer, Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 307—313 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Eichholtz)

Zur Kreislauf- und Atmungswirkung von Serotonin (5-Hydroxytryptamin) am wachen Hund

Von
E. Schmid, H. Waltz und G. Freund

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. Dezember 1955)

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen führt Serotonin zu verschiedenartigen Kreislauf- und Atmungsreaktionen: Bei Katzen wird anscheinend regelmäßig ein Bezold-Jarisch-Reflex — mit Atmungshemmung, Blutdruckabfall und Bradykardie — ausgelöst. Am narkotisierten Hund kann es nach Serotonininjektion dagegen zu Senkung oder Steigerung des Blutdrucks, Tachykardie oder Bradykardie kommen. (Page; Freyburger u. Mitarb., Schneider u. Yonkman, McCanon u. Horvath, Page u. McCubbin, Heymans u. van den Heuvel-Heymans.)

Auf die besonderen Kreislaufreaktionen narkotisierter Tiere wurde von Wezler wiederholt hingewiesen. Daher schien es notwendig, die Kreislauf- und Atmungswirkungen von Serotonin erneut am wachen Hund zu studieren. Die Schroederschen Methoden erlaubten dabei eine fortlaufende Aufzeichnung der wesentlichen Kreislaufgrößen. Außerdem sollten mögliche Zusammenhänge zwischen Dosis, Injektionsgeschwindigkeit und Richtung der Serotonineffekte geklärt werden.

Versuchsanordnung

An 3 nichtnarkotisierten, dressierten Carotisschlingen-Hunden registrierten wir die Atmung, sowie den Blutdruck nach Schroeder. In 20 Versuchen erfolgten Kreislaufanalysen nach Wezler u. Böger. Insgesamt führten wir 103 Versuche mit Serotonin in Form des Creatininsulfats oder des Hydrochlorids durch[1]. Die Injektionszeit betrug 5 sec bzw. 1—3 min. Da äquimolare Mengen von Serotonin-Creatininsulfat bzw. -Hydrochlorid gleiche Atmungs- und Kreislaufreaktionen auslösten, sind sämtliche Dosen auf den Gehalt an freier Base umgerechnet.

Versuchsergebnisse

Serotoninmengen bis 2 γ/kg hatten keine deutlichen Kreislaufwirkungen. 2—5 γ/kg, *in 5 sec injiziert*, führten bei allen Tieren zu einer 10 bis 15 sec dauernden Senkung des arteriellen Mitteldrucks mit verkleinerter

[1] Für die freundliche Überlassung von Serotonin-Creatininsulfat danken wir den Firmen E. Merck, Darmstadt und C. H. Boehringer Sohn, Ingelheim, für Serotonin-Hydrochlorid der Firma Knoll, Ludwigshafen.

Blutdruckamplitude und Tachykardie. Vor Einsetzen der Kreislaufveränderungen wurde die Atmung für etwa 5—10 sec gehemmt, wobei sich die Herzfrequenz gleichzeitig verminderte.

Nach Injektion von 8—15 γ Serotonin/kg (gelegentlich schon nach 5 γ/kg) kam es bei Senta und Bibela zur Erhöhung des arteriellen Mitteldrucks um 5—20 mm Hg für 1—3 min. Hella reagierte nur in 5 von 8 Versuchen bei 10 γ/kg mit einem Blutdruckanstieg; 15—20 γ/kg steigerten auch bei diesem Tier regelmäßig den Mitteldruck um 15—30 mm Hg. Die Blutdruckamplitude war dabei unverändert oder verbreitert, die Herzfrequenz erhöht bzw. in 9 von 19 Versuchen mit 8—20 γ/kg wohl reflektorisch über die Pressoreceptoren — vermindert. Vor

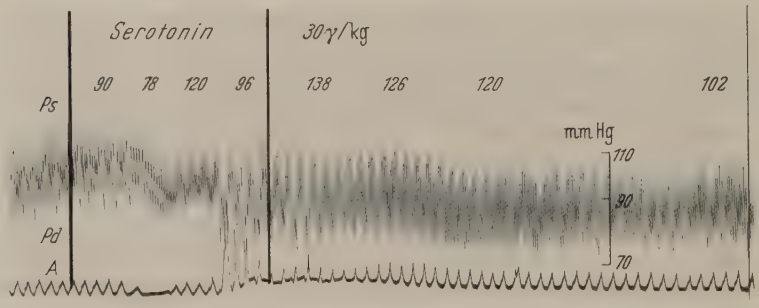


Abb. 1. Hella, 25 kg. Zwischen den Lichtmarken Injektion von 30 γ Serotonin/kg in 1 min. Ps = systolischer, Pd = diastolischer Blutdruck, A = Atmung. Zahlen über der Blutdruckregistrierung = Herzfrequenz/min. Nähere Erläuterungen im Text

Einsetzen des Blutdruckanstiegs kam es nach 10—20 γ/kg immer, nach 5—8 γ/kg häufig zu einer heftigen Hyperpnoe, die etwa in der Hälfte der Versuche von einem über nur wenige verlangsamte Herzschläge anhaltenden Blutdruckabfall begleitet war.

Wurden 10—40 γ/kg/min *1—3 min lang* injiziert, so kam es zu Kreislaufeffekten, die sich aus den oben beschriebenen Reaktionen zusammensetzten. Im allgemeinen fiel dabei der arterielle Mitteldruck um etwa 5—20 mm Hg 30—45 sec nach Injektionsbeginn, die Blutdruckamplitude war anfänglich verkleinert, die Herzfrequenz nahm zu. Bei Bibela und Senta folgte dem initialen Blutdruckabfall regelmäßig ein Anstieg um 5—10 mm Hg über den Ausgangswert, dem sich, besonders bei Fortsetzung der Injektion bis zu 3 min, ein erneuter Blutdruckabfall mit verbreiterter Amplitude anschloß. Die 2. Phase (Blutdruckanstieg) fehlte bei Hella oder war weniger deutlich ausgeprägt als bei Senta und Bibela (Abb. 1). Diese Veränderungen von Blutdruck und Herzfrequenz wurden teilweise noch kompliziert durch die weiter oben beschriebenen, mit den Atmungsveränderungen zusammenhängenden Reaktionen (Abb. 1). Nach Serotoninmengen bis 15 γ/kg/min kam es meist zu einer

Atmungshemmung, nach höheren Dosen zu Atmungshemmung bzw. Hemmung mit anschließender Erregung (Abb. 1).

Die Zeitspanne von Injektionsbeginn bis zum Auftreten einer Atmungshemmung bzw. -erregung nach Serotonin erschien kürzer als die in früheren Versuchen mit Nicotin, ATP oder Äthylendiamin beobachtete Latenzzeit (vgl. Wagenmann; Wagenmann, Schmid u. Taugner; Schmid, v. Bubnoff u. Taugner). Wir verglichen daher bei alternierender Injektion in jeweils 5 sec die Atmungserregung nach 8—10 γ Serotonin/kg mit der nach 20—50 γ Lobelin/kg. BeiSerotonin (12 Injektionen) trat der erste „tiefe Atemzug" 12—16 sec, bei Lobelin (14 Injektionen) 16—29 sec nach Injektionsbeginn auf. Die Zeitdifferenz betrug 4—13, im Mittel etwa 7 sec.

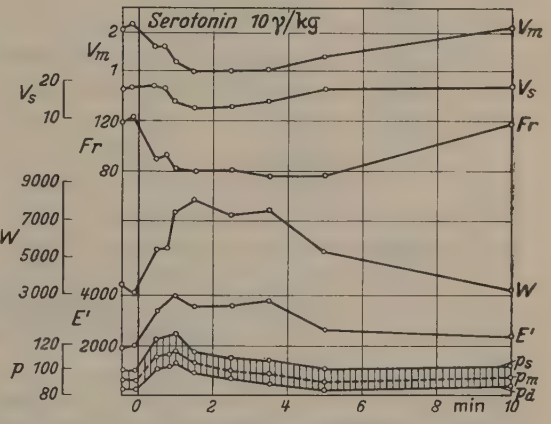


Abb. 2. Hella, 25 kg. Kreislaufanalyse nach Wezler u. Böger bei Injektion von 10 γ Serotonin/kg in 5 sec. Vm = Minutenvolumen (l), Vs = Schlagvolumen (cm³), Fr = Herzfrequenz/min, W = gesamter peripherer Widerstand (dyn · sec/cm⁵), E′ = Elastizitätskoeffizient (dyn/cm⁵), ps = systolischer, pd = diastolischer Blutdruck, pm = Mitteldruck

In 7 Kreislaufanalysen nach Wezler u. Böger wurden 10—15 γ Serotonin/kg *in 5 sec* injiziert. Herzfrequenz, Schlag- und Minutenvolumen waren dabei 6mal vermindert, der elastische und der gesamte periphere Widerstand erhöht (Abb. 2). Auffallenderweise kehrten diese Kreislaufgrößen, im Gegensatz zu der nur 1—3 min anhaltenden Blutdrucksteigerung, meist erst nach 8—10 min zur Norm zurück. Nur in einer Analyse waren Herzfrequenz und Minutenvolumen erhöht und der periphere Widerstand praktisch unverändert, während die Pulswellengeschwindigkeit und der Elastizitätskoeffizient wie in den übrigen Kreislaufanalysen zunahmen.

12 Analysen erfolgten bei *1—3 min* dauernder Injektion von 10 bis 40 γ Serotonin/kg/min. Bei Hella kam es, neben Blutdrucksenkung und Tachykardie, zu Minutenvolumenerhöhung und Senkung des gesamten peripheren Widerstands um etwa 50% (Abb. 3). Bei Bibela waren Minutenvolumenzunahme und Widerstandsabfall etwas schwächer ausgeprägt; das gleiche gilt für Senta bei Zufuhr von 10—15 γ/kg/min (Ähnliche Reaktionen traten bei diesem Tier auch bei Injektion von 2 γ/kg *in 5 sec* auf.) Wurde die Serotonindosis auf 30 γ/kg/min erhöht, so

reagierte dieses Tier, im Gegensatz zu Hella und Bibela, mit Verminderung von Schlag- und Minutenvolumen und Steigerung des elastischen und peripheren Widerstands.

Diskussion der Versuchsergebnisse

Auch am wachen Hund führte Serotonin nach den vorliegenden Versuchen zu verschiedenartigen Kreislaufreaktionen. Nach den Veränderungen des gesamten peripheren Widerstands beurteilt kam es

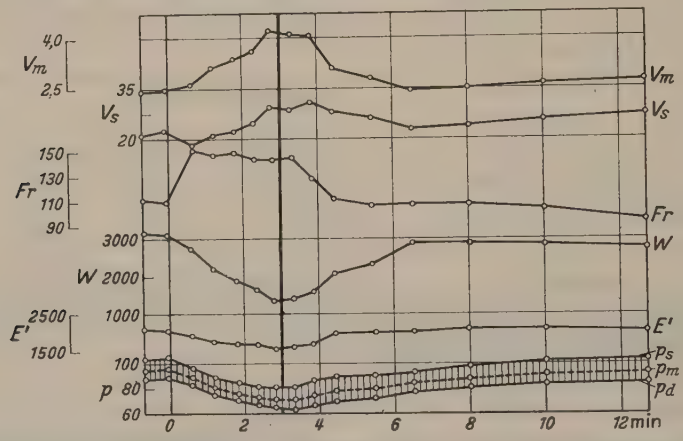


Abb. 3. Hella, 25 kg. Kreislaufanalyse nach Wezler u. Böger bei 3 min dauernder Injektion von 15 γ Serotonin/kg/min. Vgl. Legende der Abb. 2

dabei, in Abhängigkeit von Dosierung und Injektionsgeschwindigkeit, zu vorwiegend gefäßverengernder oder gefäßerweiternder Wirkung.

Es fragt sich, wie diese verschiedenen Effekte zustande kommen. Eine Gefäßerweiterung könnte durch Hemmung nervöser vasokonstriktorischer Impulse, die von Page u. McCubbin an den Extremitätengefäßen nachgewiesen wurde, zustande kommen. Die Nierengefäße des Hundes können nach Corcoran u. Mitarb. bei Serotonininfusion ebenfalls erweitert werden[1]. Die „noradrenalinartigen" Kreislaufeffekte bei rascher Serotonininjektion sind dagegen, nach den Veränderungen des elastischen und peripheren Widerstands zu urteilen, nicht nur durch periphere Vasokonstriktion, sondern auch durch vermehrte Tonisierung der „Windkessel"-Gefäße bedingt (vgl. Wezler u. Böger, Duesberg u. Schroeder). Über die Durchströmungsänderungen an einzelnen Gefäßbezirken nach Serotonininjektion scheinen bisher keine Untersuchungen vorzuliegen, die die Befunde von Page u. McCubbin über die Bedeutung

[1] v. Bubnoff u. Mitarb. fanden bei intraarterieller Serotonin-Injektion keine Gefäßverengung an der Katzenniere, bei künstlich erhöhtem Gefäßtonus ebenfalls eine Vasodilatation. Nach Erspamer u. Mitarb. wirkt dagegen Serotonin an der Rattenniere gefäßverengend.

der Gefäßinnervation für den Serotonineffekt berücksichtigen. Reid u. Rand beschrieben eine zusätzliche Erregung des Nebennierenmarks; nach Schneider, Gaunt u. Earl, sowie Ginzel u. Kottegoda wird dagegen die Serotoninwirkung durch Ausschaltung des Nebennierenmarks nicht modifiziert. Eine Ausschüttung von Adrenalin oder einer Mischung von Adrenalin und Noradrenalin ist nach unseren Kreislaufanalysen ebenfalls unwahrscheinlich. Die Tatsache, daß Serotonin auch bei Blutdrucksteigerung zur Tachykardie führen kann, seine stimulierenden Eigenschaften am isolierten Herzen dagegen nach Schneider u. Yonkman, sowie Freyburger u. Mitarb. gering sind, könnte für eine zusätzliche Erregung der cardiovasculären Zentren durch Serotonin sprechen. Die unterschiedlichen Effekte gleicher Serotoninmengen bei verschiedener Injektionsgeschwindigkeit könnten mit dem raschen oxydativen Abbau zusammenhängen (vgl. Blaschko u. Philpot, sowie Bradley u. Mitarb.), vielleicht auch mit einer Inaktivierung durch Serotoninaufnahme in die Thrombocyten (vgl. Humphrey u. Toh).

Atmungshemmung und -erregung durch Serotonin sollen nach Schneider u. Yonkman durch cardiopulmonale Reflexe ausgelöst werden. Douglas u. Toh nahmen dagegen an, daß die Atmungserregung über die Chemoreceptoren und das Atmungszentrum zustande kommt; Heymans u. van den Heuvel-Heymans schlossen auf eine zentrale Stimulation. Nimmt man an, daß die Latenzperiode von Injektionsbeginn bis zum ersten „tiefen Atemzug" im wesentlichen durch die Kreislaufzeit von der Injektionsstelle bis zu den Receptoren bedingt ist, so würde die im Vergleich zu Lobelin früher einsetzende Serotonin-Hyperpnoe für die Annahme cardiopulmonaler Atmungsreflexe sprechen.

Die mit diesen Atmungsveränderungen gekoppelten Kreislaufreaktionen sind wohl als unspezifisch anzusehen: Eine respiratorische Apnoe nach „tiefem Atemzug" oder eine durch andere Pharmaka ausgelöste Atmungshemmung war in früheren Versuchen ebenfalls mit Bradykardie verbunden (Wagenmann; Wagenmann, Schmid u. Taugner; Mosdzien). Auch der mit der Hyperpnoe einsetzende kurze Blutdruckabfall mit einigen verlangsamten Herzschlägen konnte nicht nur bei Serotonin, sondern auch bei Lobelin oder Nicotin beobachtet werden. Demnach ist wohl auch diese initiale, schon von Page, sowie Freyburger u. a. beschriebene Serotoninwirkung keine spezifische Reaktion.

Zusammenfassung

An wachen Carotisschlingen-Hunden wurden die Kreislauf- und Atmungswirkungen von Serotonin mit den Schroederschen Methoden untersucht.

Kleine bzw. langsam zugeführte größere Dosen wirkten vorwiegend gefäßerweiternd und atmungshemmend, rasch injizierte größere Mengen

führten zu Vasokonstriktion und Atmungserregung. Mit den Atmungsveränderungen waren zusätzliche Umstellungen des Kreislaufs verbunden. Die Ursachen der verschiedenartigen Serotonin-Effekte werden diskutiert.

Herrn Prof. Dr. F. Eichholtz sind wir für wertvolle Anregungen und die freundliche Förderung der Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Literatur

Blaschko, A. W., and F. J. Philpot: Enzymic oxidation of tryptamine derivatives. J. of Physiol. **122**, 403 (1953). — Bradley, T. R., R. F. Butterworth, G. Reid and E. M. Trautner: Nature of lung enzyme which inactivates serum vasoconstrictor. Nature **1950**, Nov. 25, S. 911. — v. Bubnoff, M., H. F. Orth u. D. Schnell: Über die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin auf die Durchblutung der normalen, ischämischen und hypoxischen Niere (in Vorbereitung). — McCanon, D. M., and S. M. Horvath: Some effects of serotonin in pentobarbital anesthetized dogs. Amer. J. Physiol. **179**, 131 (1954). — Corcoran, A. C., G. M. C. Masson, F. del Greco and I. H. Page: 5-hydroxytryptamine (serotonin): Its lack of specific renal activity. Arch. internat. Pharmacodynamie **97**, 483 (1954). — Douglas, W. W., and C. C. Toh: The respiratory stimulant action of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the dog. J. of Physiol. **120**, 311 (1953). — Duesberg, R., u. W. Schroeder: Pathophysiologie und Klinik der Kollapszustände. Leipzig: S. Hirzel 1944. — Erspamer, V., and P. Correale: Further observations on the action of 5-hydroxytryptamine (5-HT) on the urine flow and chloride excretion of the rat. Arch. internat. Pharmacodynamie **101**, 99 (1955). — Erspamer, V., and A. Ottolenghi: Pharmacological studies on enteramine. VIII. Action of enteramine on the diuresis and the renal circulation of the rat. Arch. internat. Pharmacodynamie **93**, 177 (1953). — Freyburger, W. A., B. E. Graham, M. M. Rapport, P. H. Seay, W. M. Govier, O. F. Swoap and M. J. Vander Brook: The pharmacology of 5-hydroxytryptamine (serotonin). J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **105**, 80 (1952). — Ginzel, K. H., and S. R. Kottegoda: A study of the vascular actions of 5-hydroxytryptamine, tryptamine, adrenaline and nor-adrenaline. Quart. J. Exper. Physiol. **38**, 225 (1953). — Heymans, C., et G. van den Heuvel-Heymans: Sur la pharmacologie de l'hydroxytryptamine (sérotonine) et d'une substance analogue. Arch. internat. Pharmacodynamie **93**, 95 (1953). — Humphrey, J. H., and C. C. Toh: Absorption of serotonin (5-hydroxytryptamine) and histamine by dog platelets. J. of Physiol. **124**, 300 (1954). — Mosdzien, G.: Über die Atmungs- und Kreislaufwirkung von Adrenalin, Noradrenalin, Corbasil, 3,4-Dioxyephedrin, Sympatol, Suprifen, Epinin, Norepinin und 3,4-Dioxyphenyl-Morpholin am nichtnarkotisierten Hund. Dissertation, Heidelberg 1955. — Page, I. H.: The vascular action of natural serotonin, 5- and 7-hydroxytryptamine and tryptamine. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **105**, 58 (1952). — Serotonin (5-hydroxytryptamine). Physiologic. Rev. **34**, 563 (1954). — Page, I. H., and J. W. McCubbin: The variable pressure response to serotonin in laboratory animals and man. Circulation Res. **1**, 354 (1953). — Reid, G., and M. Rand: Pharmacological actions of synthetic 5-hydroxytryptamine (serotonin, thrombozytin). Nature **169**, 799 (1952). — Schmid, E., M. v. Bubnoff u. R. Taugner: Zur Kreislaufwirkung der Purinkörper am wachen Hund. Arzneimittel-Forsch. **5**, 194 (1955). — Schneider, J. A., R. Gaunt and A. E. Earl: Effect of adrenal cortical and medullary factors on the cardiovascular response to serotonin (5-hydroxytryptamine) in the dog. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **110**, 45 (1954). — Schneider, J. A., and F. F. Yonkman: Species differences in the respiratory and

cardiovascular response to serotonin (5-hydroxytryptamine). J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **111**, 84 (1954). — Schroeder, W.: Methodik der fortlaufenden Kreislaufanalyse am Hunde. Arch. Kreislaufforsch. **15**, 24 (1949). — Ein einfaches Gerät zur Verstärkung des arteriellen Pulsdruckes und zur fortlaufenden Registrierung der Pulswellengeschwindigkeit. Z. exper. Med. **117**, 181 (1951). — Thauer, R., u. K. Wezler: Die Kreislaufwirkung der gebräuchlichsten tierexperimentellen Narcotica. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **200**, 84 (1942). — Wagenmann, U.: Über die Atmungs- und Kreislaufwirkung von Magnesiumsulfat, Adenosinkörpern und Nicotin beim nichtnarkotisierten Hund. Dissertation, Heidelberg 1955. — Wagenmann, U., E. Schmid u. R. Taugner: Vergleichende Untersuchungen über die Atmungs- und Kreislaufwirkung der Adenosinkörper am wachen Hund. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 416 (1955). — Wezler, K., u. A. Böger: Die Dynamik des arteriellen Systems. Erg. Physiol. **41**, 292 (1939). — Wezler, K., u. R. Thauer: Unblutige Druckregistrierung am Tier mittels der Carotisschlinge. Z. exper. Med. **108**, 377 (1941). — Unblutige Schlag- und Minutenvolumbestimmung am Hunde ohne Narkose. Z. Kreislaufforsch. **33**, 486 (1941). — Weitere Einzelheiten und Literaturangaben sind in der Dissertation von G. Freund, Heidelberg 1956, enthalten.

Dr. E. Schmid, Medizinische Klinik der Universität Erlangen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 314—321 (1956)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. Hans Schaefer)

Über die Kreislaufwirkung von 4 Methyl—2 Aminopyridin*

Von
U. Gottstein, H. Hille, A. Oberdorf und H. Schaefer

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. Dezember 1955)

Dingemannse, Dohrn und Wibaut untersuchten vom Nicotin ausgehend, erstmalig die pharmakologische Wirkung der von Seide synthetisierten Aminopyridine und erkannten 2 wesentliche Eigenschaften, nämlich 1. Blutdrucksteigerung an der Spinalkatze, 2. lokalanaesthetische Wirkung am Frosch. Die Substanz wurde dann im Anschluß an diese Arbeit längere Zeit pharmakologisch nicht weiter untersucht. — Erst 25 Jahre später entdeckten Shaw u. Benthly eine weitere Eigenschaft von Aminopyridin, nämlich die analeptische Wirkung auf die Morphin-Skopolamin-Narkose.

Haxthausen griff nun in seinen Untersuchungen diese Stoffgruppe wieder auf und fand im 4-Methyl-2 Aminopyridin (MAP) eine Substanz, die außer der blutdrucksteigernden Wirkung noch eine erhebliche positive Inotropie am Herz-Lungen-Präparat zeigt. Wir versuchten die Kreislaufwirkung von MAP näher zu analysieren.

Methodik

Für die Versuche verwendeten wir 32 Hunde im Gewicht von 18—30 kg, die mit 70 mg/kg Chloralose in 1,4 cm^3/kg 25%iger Urethanlösung — nach Vormedikation von 1,0 mg/kg Morphium — narkotisiert wurden. Die Raumtemperatur lag zwischen 20 und 25° C.

Der arterielle Blutdruck wurde mit einem kapazitiven Meßgerät nach Neuhaus[1] registriert, dessen Meßkopf endständig über eine zwischengeschaltete Jarisch-Kanüle in die Arteria brachialis eingebunden wurde. Die Herzfrequenz registrierten wir mit dem Zeitordinatenschreiber nach Schaefer, Bleicher, Eckervogt, gesteuert vom Druckmeßgerät. Der Druck im rechten Vorhof wurde mit einem empfindlichen Straingage-Manometer von Statham gemessen, das an einen in die Ven. Jugular. eingeführten Katheder angeschlossen war. Die Durchblutung der untersuchten Gefäße wurde mit nach Oberdorf u. Wilcke modifizierten Reinschen Elementen meist blutig gemessen. Wir registrierten das Stromvolumen der Arteria femoralis, der Vena fem. und der Arteria femoralis post. sup., eines

* Versuchsname W 45, im Handel als „Ascensil" (geschützter Name der Firma „Atmos" Fritsching).

[1] Elektrophysik Bonn.

Muskelastes, der praktisch nur die Adductoren der hinteren Extremitäten versorgt; weiter die Arteria saphena als Hautgefäß, die Arteria coronaria sinistra und dextra sowie die Arteria carotis interna. Die Muskeldurchblutung wurde außerdem vergleichend mit der Calorimetersonde nach HENSEL[1], die Hautdurchblutung mit dem Strömungscalorimeter nach HENSEL[2] registriert. Quantitative Aussagen über die Durchblutung machten wir nur, wenn 1. die Elemente bei mehreren Eichungen gleiche Exponenten aufwiesen, 2. die Elementnullinie während des Versuchs unverändert blieb, 3. am Versuchsende eine blutige Schlußeichung möglich war.

Die Querschnittsveränderung der Gefäße der hinteren Extremität wurden mit einem Impedanzplethysmographen nach SCHAEFER (Literatur siehe BROSE) oder einem photoelektrischen Meßgerät registriert.

Die Reizung des Hinterbeines führten wir mit Kondensatorentladungen durch, mit einer Frequenz von 10 Hz und einer Spannung von 10—30 Volt.

Die Wirkung auf das Herz und den Blutdruck

Die minimalwirksame intravenöse Dosis betrug 0,3 mg/kg. Oberhalb dieser Dosierung erhielten wir (bis zu 3,0 mg/kg) in allen Fällen eine Verlangsamung der Herzfrequenz bei gleichzeitigem Anstieg des Blutdruckes, und zwar im Dosisbereich unter 1,0 mg/kg MAP vorwiegend durch Erhöhung des diastolischen Druckes, während oberhalb dieser Dosierung die Zunahme des systolischen Druckes überwiegt (Abb. 1). Es müssen also 2 Phasen in der Blutdruckwirkung von MAP unterschieden werden. Die erste, — bei niedriger Dosierung — ist sicher ein Druckanstieg durch Vergrößerung des peripheren Widerstandes, die zweite wohl eine Kombination von Widerstandshochdruck mit Schlagvolumenhochdruck, durch die erst in höherer Konzentration einsetzende positiv inotrope Wirkung, oder die Entleerung von Blutspeichern.

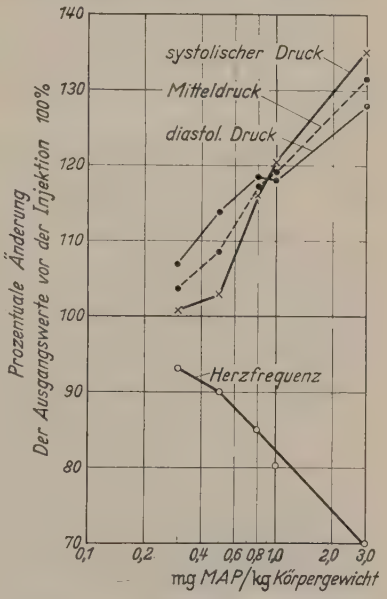


Abb. 1. Das Verhalten von Blutdruck und Herzfrequenzordinate bei intravenösen Injektionen von MAP in steigenden Dosen. Die Herzfrequenz nimmt mit zunehmender Dosierung ab. Der Druckanstieg erfolgt bei niedriger Dosierung vorwiegend diastolisch, während bei höherer Dosierung die kardiale Komponente überwiegt, was durch den stärkeren Anstieg des systolischen Druckes erkennbar wird. (Mittelwerte aller untersuchten Tiere)

Daß die Herzkraft bei niedriger Dosierung wenig beeinflußt wird, wird auch durch das Verhalten des Vorhofdruckes wahrscheinlich gemacht. Dieser ist bei Injektionen bis zu 1,0 mg/kg intravenös kaum verändert, während bei größeren Gaben ein Anstieg der oberen Druckwerte

bis zu 3 cm H_2O über das Ausgangsniveau resultiert. Diese oberen Druckwerte wird man, bei mit Sicherheit gedrosseltem peripherem Kreislauf, als ein Maß zunehmender Vorhofkraft betrachten können.

Sehr interessant ist die Reaktion, wenn MAP direkt in die Arteria coronaria gespritzt wird. Bei einer Injektion von 0,03 mg/kg MAP steigt der Blutdruck sowohl systolisch als auch diastolisch an. Es ist dies ein recht sicherer Hinweis auf eine positiv inotrope Herzwirkung auch am intakten Tier, da eine solche Dosis mit Sicherheit intravenös unwirksam ist, ein Anstieg des Blutdruckes durch periphere Gefäßkonstriktion demnach ausgeschlossen ist.

Vergleichen wir die Dosierungen mit denen, die v. Haxthausen am Herz-Lungen-Präparat der Ratte verwendet, um eine gute positiv

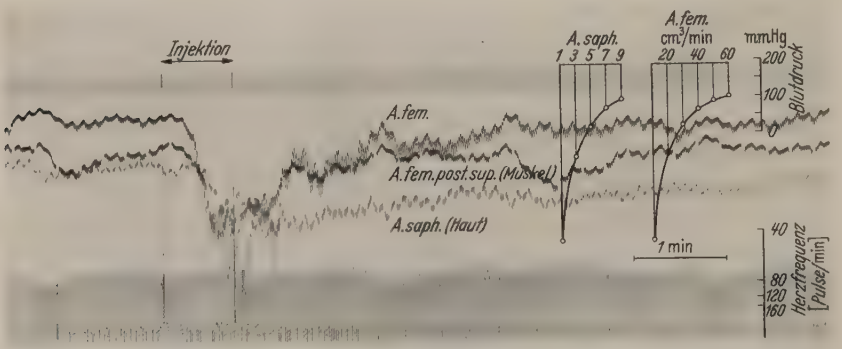


Abb. 2. Typisches Bild einer intraarteriellen MAP-Injektion von 0,05 mg/kg. Man sieht wie alle registrierten Gefäße der hinteren Extremität eines Hundes nach der Injektion mit einer Stromvolumenminderung reagieren. Die Vergrößerung des peripheren Widerstandes wird nicht allein durch die Verringerung der Durchblutung erkennbar, sondern auch durch die stärkeren pulsatorischen Schwankungen bei gleichbleibender Herzfrequenz und unverändertem Blutdruck. (Falsche Anzeigen durch Blutrückfluß bei starker Pulsation sind mit asymmetrischen Elementen erst bei wesentlich stärkerer Pulsation zu erwarten)

inotrope Wirkung zu sehen, so finden wir etwa gleiche Werte. Setzen wir die Blutmenge des Tieres mit etwa $^1/_{10}$ des Körpergewichtes an, so bekommen wir eine Substanzverdünnung im Blut von 1:100000 bei unseren Versuchen. v. Haxthausen sah deutliche Effekte bei dieser Verdünnung. Die Wirkungsdauer von MAP ist relativ lang; nach 45 min haben Blutdruck und Herzfrequenz ihr Ausgangsniveau noch nicht wieder erreicht. Das ist für ein narkotisiertes Tier ungewöhnlich, denn die meisten mit unserer Versuchsanordnung getesteten Kreislaufsubstanzen, darunter fast alle handelsüblichen Kreislaufmittel, wirken kürzere Zeit.

Wirkung auf den peripheren Kreislauf

Um Interferenzen von druckpassiven Stromvolumschwankungen mit echten pharmakologischen Wirkungen zu vermeiden, injizierten wir die Substanz auch intraarteriell in die Gefäße des Hundebeines. An der

ruhenden Extremität erhielten wir immer Abnahmen der Durchblutung in der Art. fem. sowie in Haut- und Muskelgefäßen (Abb. 2). Wurde dagegen das Bein durch elektrische Reizung zum Zucken gebracht, so sahen wir nach den Injektionen häufiger Mehrdurchblutung im Muskel bei erhaltener Abnahme der Hautdurchblutung. Blutdruck und Herzfrequenz waren bei allen Reaktionen unbeeinflußt.

Aus der Interferenz der konstringierenden Wirkung der Droge mit der erweiternden der Katabolite resultiert für die Arteria femoralis eine geringe Durchblutungsabnahme nach MAP am arbeitenden als am

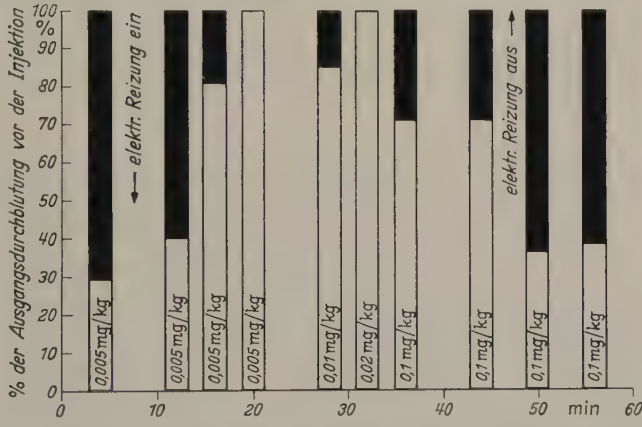


Abb. 3. Abschwächung der durchblutungsvermindernden Wirkung von MAP durch elektrische Reizung der Beinmuskulatur eines Hundes (Reizfrequenz 1 Hz). Es wurde die Gesamtdurchblutung einer hinteren Extremität gemessen. Die schwarzen Säulen geben die Drosselung der Blutzufuhr an, 100% entsprechen jeweils der Durchblutung vor der Injektion, die in allen Fällen intraarteriell in die A. femoralis erfolgte. Die Durchblutung stieg während der elektrischen Reizung auf das 2,5fache an

ruhenden Bein (Abb. 3). Die Durchblutung, die am ruhenden Bein um 70% gedrosselt wird, erfährt nach 10 min elektrischer Reizung nur noch eine Minderung um 20%, um nach weiter anhaltender Reizung unbeeinflußbar zu werden. Gewiß wird das Mittel stärker verdünnt; das Stromvolumen steigt nach der Reizung auf das 2,5fache an, es führt aber die 20fache Ausgangsdosis in diesem Zustand auch nur zu einer Drosselung um 30%. Die Verdünnung der Substanz durch das höhere Stromvolumen kann also den Effekt nicht erklären.

Daß die Gefäße arbeitender Muskeln durch MAP weniger stark kontrahiert werden als die ruhenden Muskeln zeigen auch die Befunde an den Herzkranzgefäßen, wo wir bei 5 Tieren an 13 intravenösen Injektionen von 1,0 mg/kg die Durchblutung der A. coronaria mit der Durchblutung der A. femoralis verglichen. Die Injektionen führten in allen Fällen zum gewohnten Blutdruckanstieg, der in den Herzkranzgefäßen 7mal zur Mehrdurchblutung führte. Nur 5mal war die Vergrößerung des Widerstandes im Coronarkreislauf so stark, daß trotz

Druckanstieg eine Minderdurchblutung erfolgte. Das Stromvolumen der A. femoralis wurde dagegen bei allen Injektionen verringert.

Die Durchmesser von A. femoralis, sowie von Haut- und Muskelgefäßen, die mit dem Arterienplethysmographen gemessen wurden, ließen in keinem Fall eine aktive Beeinflussung der großen und mittleren Gefäße erkennen. Wir sahen nur druckpassive Schwankungen.

Wirkung auf den Dilatol- und Histaminkollaps

2,0 mg/kg MAP intravenös verhindern weitgehend die Wirkung einer nachgespritzten Dilatoldosis* von 10,0 γ/kg, die sonst sicher zum Kollaps führt. Der Blutdruck sinkt nicht unter das Ausgangsniveau ab, die Herzfrequenz wird nur andeutungsweise beschleunigt. Auch ein bereits gesetzter Dilatolkollaps wird durch 1,0—2,0 mg/kg MAP behoben.

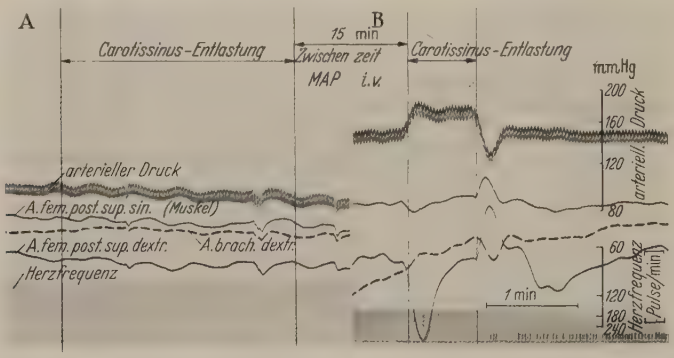


Abb. 4. Carotissinusentlastung vor und nach MAP an einem Hund in schlechtem Kreislaufzustand. *A* Unvorbehandelt bleibt der Kreislauf von der Carotissinusentlastung völlig unbeeinflußt. *B* Nach 15 min, während der 2mal 2,0 mg/kg MAP intravenös gespritzt wurden, reagieren Gefäßdurchblutung und Blutdruck wieder in der gewohnten Weise

Der Blutdruck erreicht fast seine ursprüngliche Höhe, die Herzfrequenz normalisiert sich. Die respiratorischen Blutdruckschwankungen, die im Kollaps fehlten, kehren wieder. Die Durchblutung der A. femoralis nimmt ab, die der V. femoralis vorübergehend zu. Es kommt also zur peripheren Entspeicherung.

Nicht so überzeugend waren in unsern Versuchen die Erfolge beim Histaminkollaps, der beim Hund, im Gegensatz zur Katze (v. Haxthausen) nicht so gut beeinflußt wird.

MAP und Carotissinusreflex

Der Kreislaufreflex auf beidseitige Carotissinusentlastung führt am Hund im guten Kreislaufzustand unter Chloralose-Urethan-Narkose zum Anstieg des arteriellen Druckes, wobei die Durchblutung der Muskeln

* Dilatol - Warenzeichen für Phenyl-isobutyl-nor-oxyephedrin-chlorhydrat.

der hinteren Extremität abnimmt, die Hautdurchblutung druckpassiv oft etwas ansteigt. Am kreislaufgeschädigten Tier kann dieser Reflex völlig aufgehoben sein, auch wenn der mittlere arterielle Blutdruck noch 70—100 mm Hg beträgt. Durch MAP (4,0—5,0 mg/kg intravenös) war es möglich, die gewohnte Reaktion auf die Carotissinusentlastung wieder herzustellen (Abb. 4).

Interferenz mit Adrenalin und Regitin, sowie Tachyphylaxie*

Adrenalin, in drucksenkender Dosis intravenös gespritzt, büßt an depressorischem Effekt durch MAP wesentlich ein. Auch die Tachykardie nach Adrenalin ist stark abgeschwächt, wenn 1,5 min vor der Adrenalininjektion 1,0 mg/kg MAP gegeben wird. 0.4 mg/kg Regitin intravenös haben kaum einen Einfluß auf nachfolgende Injektion von MAP.

Wurden mehrere Injektionen von MAP vorgenommen, so sahen wir eine additive Wirkung, wenn die Reaktion auf die Erstinjektion noch nicht abgeklungen war. Tachyphylaxie beobachteten wir nie.

Besprechung der Ergebnisse

Die Wirkung auf den Kreislauf besteht fraglos in einer Verengerung fast aller Gefäße, insbesondere der Haut, auf jeden Fall auch des ruhenden Muskels. Wie weit außerdem eine Wirkung auf die Inotropie des Herzens vorliegt, ist nicht leicht zu entscheiden. Die Steigerung des systolischen Blutdruckes ist nicht unbedingt beweisend, sie kann ebensogut durch eine Entspeicherung von Blutdepots 1. und 2. Ordnung erzielt werden. Die Tatsache jedoch, daß v. Haxthausen[2] am Herz-Lungen-Präparat eine sichere positiv inotrope Wirkung von MAP nachweisen konnte, spricht durchaus dafür, daß auch in unseren Versuchen die systolischen Drucke mindestens teilweise durch positiv inotrope Wirkung erzeugt worden sind.

Recht schwierig ist die Wirkung auf die periphere Strombahn dann zu erklären, wenn es sich um veränderte Reaktionen am arbeitenden Muskel handelt. Zunächst hält man es für unwahrscheinlich, daß die Substanz in ihrer Wirkung durch die Stoffwechselvorgänge im arbeitenden Muskel umgestimmt wird. Man ist geneigt, dieses Phänomen als ein Ausdruck veränderter Strömungswiderstände anzusehen, derart, daß sich bei der Konstriktion der Hautgefäße der Eintrittsdruck in die Arteriolenstrombahn des Muskels erhöht hat. Die zweite Erklärung ist dennoch wenig wahrscheinlich, da ja der Druckabfall in den Arterien so geringfügig ist, verglichen mit denjenigen in den Arteriolen und Capillaren, daß derartige Veränderungen nicht sehr in die Waagschale

* Regitin = Warenzeichen für 2(N-p-Tolyl-N-m-Oxyphenyl-Aminomethyl)-Imidazolin.

fallen. Es ist also trotzdem zu überlegen, ob nicht durch die Einwirkung von Stoffwechselprodukten der Wirkungsmechanismus der Substanz im Muskel grundsätzlich verändert wird. Es besteht hier eine gewisse Analogie zur Wirkung des Noradrenalins, dessen dilatierende Komzonente am arbeitenden Muskel stärker hervortritt als am ruhenden, wo es allerdings auch nach Gottstein, Hille u. Oberdorf, in 30% der Fälle zur Dilatation führt.

Die Substanz wirkt offensichtlich am gleichen Ort wie Dilatol, da sie die Dilatolwirkung praktisch verhindert, eine schon eingetretene Wirkung auch aufhebt. Diese Tatsache spricht ebenfalls dafür, daß die Substanz denjenigen Mechanismus beeindruckt, der grundsätzlich zu einer Gefäßerweiterung führen kann, daß also die ambivalente Wirkung im ruhenden und arbeitenden Muskel in der Tat am gleichen Substart stattfindet. Aus alledem ist sofort verständlich, daß die Substanz mit Adrenalin in Wechselwirkung steht und die Adrenalinwirkung bezüglich ihres depressorischen Effektes wesentlich herabsetzt.

Die Vorzüge der Substanz beruhen in erster Linie in ihrer längeren Wirkungsdauer, jedoch wohl auch in ihrer analgetischen Wirkung, die v. Haxthausen[3] sicherstellte. Bei einer Reihe von hochaktiven Kreislaufsubstanzen kommt es zu Herzsensationen, ein Ereignis, welches durch die analgetische Wirkung von MAP von vornherein ausgeschlossen ist. Zum anderen dürfte es als Folge der Analgesie möglich sein, den circulus vitiosus eines reflektorischen Kreislaufkollapses auch von der sensiblen Seite zu durchbrechen und zu starke Gegenregulationen, die einer Besserung des darniederliegenden Kreislaufes abträglich sind, zu dämpfen.

Zusammenfassung

Es wird über die Kreislaufwirkung von 4-Methyl-2-Aminopyridin an 32 Hunden berichtet.

Folgende Eigenschaften der Substanz wurden gefunden:

1. Die intravenöse Schwellendosis beträgt 0,3 mg/kg.

2. Der Blutdruck steigt in allen Fällen nach MAP an, im Dosisbereich 0,3—0,8 mg/kg vorwiegend diastolisch, von 1,0 mg/kg an stärker systolisch.

3. Der Venendruck steigt bei Dosierungen über 1,0 mg/kg.

4. Die Herzfrequenz wird vermindert.

5. Bei intraarterieller Injektion werden die Gefäße der Haut und der ruhenden Muskulatur verengt; in der arbeitenden Muskulatur kann es zur Mehrdurchblutung kommen.

6. Die Durchblutung der Herzkranzgefäße wurde in 7 von 12 Fällen vergrößert, in 5 Fällen verkleinert.

7. Der Dilatolkollaps wird fast restlos, der Histaminkollaps zum großen Teil aufgehoben.

8. Die Substanz wirkt außerordentlich lang anhaltend.

Literatur

Brose, W., u. H. Schaefer: Z. Biol. **106**, 81—108 (1953). — Dingemanse, E., u. J. P. Wibaut: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **132**, 365—381 (1928). — Dohrn, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **105**. — Verh. dtsch. Pharmakol. Ges. X, 1924. — Gottstein, U., H. Hille u. A. Oberdorf: Pflügers Arch. **261**, 78—98 (1955). — v. Haxthausen, E.: [1] Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 163—171 (1955). — [2] Arzneimittel-Forsch. **5**, 370—372 (1955). — [3] Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 163 (1955). — Hensel, H., J. Ruef u. K. Golenhofen: [1]Pflügers Arch. **259**, 267—280 (1954). — Hensel, H.: [2] Z. exper. Med. **117**, 587 (1954). — Oberdorf, A., u. O. Wilcke: Z. exper. Med. **124**, 209—228 (1954). — Schaefer, H., E. Bleicher u. F. Eckervogt: Pflügers Arch. **251**, 491—503 (1949). — Schaw, F. H., and G. Benthley: Nature (Lond.) **169**, 712 (1952). — Seide, O.: Ber. dtsch. chem. Ges. **57**, 791 (1924).

Prof. Dr. H. Schaefer und Dr. H. Hille, Heidelberg,
Physiologisches Institut d. Univ., Akademiestr. 3

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 322—330 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Über den Einfluß des Thyroxins und des Hungerns auf die Aktivität der Monoaminoxydase und Dopadecarboxylase der Leber*

Von
P. Holtz, K. Stock und E. Westermann

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 3. Dezember 1955)

Die bei Hyperthyreosen bestehende erhöhte Erregbarkeit des sympathischen Nervensystems findet wenigstens zum Teil eine Erklärung in der durch die Schilddrüsenhormone verursachten Wirksamkeitssteigerung der Überträgerstoffe der sympathischen Nervenwirkung. Im Tierversuch ließ sich zeigen, daß Vorbehandlung mit *Thyroxin* zu einer Verstärkung insbesondere der *Adrenalin*wirkung im Organismus führt (Burn u. Marks; Minz u. Cohen; Thibault; Kroneberg u. Hüter).

Die erhöhte Wirksamkeit der Sympathicusstoffe hat man mit einer durch Thyroxin bewirkten Aktivitätsabnahme der *Aminoxydase* zu erklären versucht (Burn u. Spinks), eines besonders reichlich in Leber, Niere und Darm, aber auch im Nervengewebe vorkommenden Fermentes, das sympathicomimetische Amine, also auch die Sympathicusstoffe Nor-adrenalin und Adrenalin *selbst* durch oxydative Desaminierung zu inaktivieren vermag. Die Hypothese fand eine Stütze in der Beobachtung, daß es bei Kaninchen durch Verfütterung von Schilddrüsentrockenpulver in der Leber zu einer Abnahme der Aminoxydase-aktivität kommt (Burn u. Spinks). Diese Beobachtung steht in einem gewissen Gegensatz zu dem schon älteren Befund (Klein), daß die Aktivität eines anderen Oxydationsfermentes der Leber, der *d-Aminosäurenoxydase*, nach Thyroxinbehandlung nicht *ab*nimmt, sondern *zu*nimmt. Sie wäre auch schwer vereinbar mit der durch experimentelle Ergebnisse gestützten Vorstellung, daß die Schilddrüsenhormone die Synthese von Oxydationsfermenten fördern oder sie in höherer Konzentration als normal verfügbar machen, und daß umgekehrt bei schilddrüsen*losen* Tieren die Aktivität zahlreicher Fermente, z. B. der d-Aminosäuren-, Cytochrom- und Succinoxydase in der Leber abnimmt (Übersicht bei Grab).

* Kurze Mitteilung auf der Tagung der Deutschen Pharmakol. Gesellsch. in Graz 1955 E. Westermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 228 (1956).

Da die Hypothese Burns geeignet wäre, auch klinisch wichtige Wirkungen der Schilddrüsenhormone zu erklären, haben wir die Befunde an *Kaninchen*, auf die sie sich stützt, durch Versuche an *Meerschweinchen* und *Ratten* zu erweitern versucht. Gleichzeitig haben wir das Verhalten der *Dopadecarboxylase* untersucht, eines ebenfalls in der Leber vorkommenden, *nicht* oxydierenden Fermentes, das durch Decarboxylierung von Dioxyphenylalanin (Dopa) *Oxytyramin* als Muttersubstanz für die Biosynthese der Sympathicusstoffe entstehen läßt. Schließlich wurde zum Vergleich der Einfluß des *Hungerns* auf die beiden Fermentaktivitäten untersucht.

Methodik

1. Vorbehandlung der Versuchstiere

Meerschweinchen, Kaninchen und Ratten erhielten täglich subcutan 1 mg/kg *dl-Thyroxin* in 0,002 n NaOH bzw. *l-3,5,3'-Trijodthyronin* in Aqua dest., die Kontrolltiere die entsprechende Menge Lösungsmittel. Die Behandlung wurde beendet, wenn das Körpergewicht der Versuchstiere um etwa 20% abgenommen hatte: bei Meerschweinchen nach 3—5 Tagen, bei Kaninchen nach 6—11 Tagen. Bei unseren Ratten (junge, wachsende Tiere) kam es selbst nach 20tägiger Zufuhr von 1—3 mg/kg Thyroxin nicht zu einer Abnahme des Körpergewichtes, sondern nur zu einer Verzögerung der Gewichtszunahme.

In Vergleichsversuchen wurde Meerschweinchen und Ratten 3—5 Tage lang die Nahrung entzogen. Die Meerschweinchen erhielten täglich 5 cm^3/100 g Wasser mit der Schlundsonde, die Ratten Wasser ad libitum in Trinkgefäßen.

2. Zur Bestimmung der Aminoxydase- und Dopadecarboxylaseaktivität

wurde je ein vorbehandeltes und ein etwa gleichschweres Kontrolltier durch Nackenschlag getötet, entblutet und die *Leber* vollständig herausgenommen und gewogen. Durch 10 min langes Verreiben der Leber mit Quarzsand im Mörser mit m/15 Phosphatpuffer und anschließendes Zentrifugieren (5 min bei 5000 U/min) wurden Leberextrakte hergestellt (1 : 5) und in der Warburg-Apparatur die Fermentaktivitäten bestimmt.

a) Aminoxydase. Im *Hauptraum* der Reaktionsgefäße: 1,8 cm^3 Extrakt 1 : 5 bzw. Homogenat 1 : 40, 0,25 cm^3 m/50 KCN, 0,2 cm^3 m/10 Semicarbacid. Im *Einsatz*: 0,2 cm^3 15% KOH + m/50 NaCN zu gleichen Teilen. Birnenförmiger *Ansatz*: 0,25 cm^3 m/5 Tyramin, das nach eingetretenem Temperaturausgleich eingekippt wurde. O_2-Atmosphäre. 37° C.

b) Dopadecarboxylase. Im *Hauptraum*: 2,0 cm^3 Extrakt 1 : 5. Im birnenförmigen *Ansatz*: 0,4 cm^3 m/40-Dopa, das nach Temperaturausgleich eingekippt wurde. Die CO_2-Abspaltung wurde in N_2-Atmosphäre bei 37° C alle 10 min abgelesen.

3. Glykogenbestimmung

im Lebergewebe (0,5—1 g Leber) nach Pflüger; Gesamt-N der Extrakte nach Kjeldahl. Trockengewichtsbestimmung mit 0,5 g Leber bei 110° C.

4. Statistische Auswertung

der Versuchsergebnisse durch Sicherung der Differenz zweier Mittelwerte mit Hilfe der Standardabweichung. Berechnung der Fermentaktivitäten auf 1 g Feuchtgewicht, 1 g Trockengewicht, 1 mg N sowie auf das Gesamtgewicht der Leber.

Ergebnisse

1. Einfluß des Thyroxins und Trijodthyronins auf die Aminoxydase der Leber

Bei den mehrere Tage mit Thyroxin bzw. Trijodthyronin behandelten Tieren nahm neben dem Körpergewicht das Gewicht der *Leber* um etwa 20% ab. Die Leber war dunkler gefärbt und von zäher Konsistenz.

Aus der Tabelle 1 ist zu ersehen, daß bei *Meerschweinchen* nach 4—5 Tage langer Behandlung mit Thyroxin die *Aminoxydaseaktivität* der Leberextrakte erhöht ist. Bei der Berechnung auf 1 g *Feuchtgewicht* Leber ergibt sich eine Steigerung von durchschnittlich 25%. Da die Leber der hyperthyreotischen Tiere etwas wasserreicher ist, ergibt die Berechnung auf 1 g *Trockengewicht* eine etwas stärkere Zunahme der Fermentaktivität (30%). Bei Beziehung auf 1 mg *Stickstoff* gelangt man zu noch höheren Werten (+ 46%), da der N-gehalt der Leberextrakte der Thyroxintiere verringert ist. Legt man der Berechnung jedoch das durch Thyroxin stark verminderte *Gesamtgewicht* der Leber zugrunde, so verschwinden die Unterschiede zwischen Thyroxin- und Kontrolltieren.

Ähnliche Ergebnisse hatten Versuche mit *Kaninchen*, die 8 Tage lang mit Thyroxin vorbehandelt worden waren (Tab. 1). Die Aminoxydaseaktivität war — auf Feucht- und Trockengewicht bezogen — um mehr als 40% signifikant erhöht. Aber schon bei Berechnung auf den stark verminderten *Stickstoff*gehalt und noch deutlicher bei Berechnung auf das stark verminderte Gesamtgewicht der Leber ließ sich die Aktivitätssteigerung gegenüber den Kontrollen nicht mehr statistisch sichern.

In Versuchen mit *Ratten* nahm das Lebergewicht nach 18—22tägiger Thyroxinbehandlung nur um 6% im Durchschnitt ab. Daraus erklärt sich, daß hier die Aminoxydaseaktivität der Thyroxintiere auch bei Berechnung auf das Gesamtgewicht der Leber eine noch signifikante Steigerung aufweist (Tab. 1).

Trijodthyronin führte in einem Versuch an 7 Meerschweinchen zu ähnlichen Resultaten wie Thyroxin (Tab. 2). Obwohl die Lebergewichte der behandelten Tiere ebenso stark wie bei den Thyroxintieren der früheren Versuche abgenommen hatten (—21%), ergab sich bei Berechnung auf das Gesamtgewicht der Leber eine deutliche, wenn auch nicht mehr signifikante Erhöhung der Aminoxydaseaktivität (+23%).

Die an Meerschweinchen, Kaninchen und Ratten durchgeführten Versuche haben somit zu dem Ergebnis geführt, daß die Aminoxydaseaktivität der Leber durch Behandlung der Tiere mit Thyroxin bzw. Trijodthyronin, wenn überhaupt verändert, dann sicher nicht vermindert, sondern *gesteigert* wird.

2. Einfluß des Hungerns auf die Aminoxydase der Leber

Ein Versuch an 5 Meerschweinchen und 5 Ratten sollte Aufschluß darüber geben, ob auch eine durch *Nahrungsentzug* bedingte

Tabelle 1. *Thyroxin* (siehe Methodik)

	Körpergewicht in g				Lebergewicht in g	
	Kontrolltiere		Thyroxintiere			
	Ausgangsgewicht	Endgewicht	Ausgangsgewicht	Endgewicht	Kontrolltiere	Thyroxintiere
Meerschweinchen						
Mittelw. (5 Tiere)	422	417 (— 1%)	419	338 (— 19%)	13,70	10,60 (—22 %)
Kaninchen						
Mittelw. (3 Tiere)	2440	2400 (— 1,5%)	2380	1830 (— 23%)	72,80	60,90 (— 16%)
Ratten						
Mittelw. (5 Tiere)	153	235 (+ 54%)	155	200 (+ 29%)	9,67	9,21 (— 6%)

Aminoxydaseaktivität der Leberextrakte

	mm³ O_2/Std pro							
	1 g Feuchtgewicht		1 g Trockengewicht		1 mg N		Gesamtleber	
	Kontr.	Thyr.	Kontr.	Thyr.	Kontr.	Thyr.	Kontr.	Thyr.
Meerschweinchen								
Mittelwerte . . .	243	304	826	1077	12,88	18,85	3160	3308
Differenz	+ 25%		+ 30%		+ 46%		+ 6%	
P-Wert	0,1—0,2		0,05—0,1		0,001—0,01		0,7—0,8	
Kaninchen								
Mittelwerte . . .	713	1069	2528	4110	42,80	54,90	52000	65266
Differenz	+ 50%		+ 63%		+ 28%		+ 25%	
P-Wert	0,001—0,01		0,02—0,05		0,1—0,2		0,3—0,4	
Kaninchen (Leberhomogenat)								
Mittelwerte . . .	2913	4173	10310	16090	131,40	155,00	222516	258446
Differenz	+ 43%		+ 56%		+ 19%		+ 16%	
P-Wert	0,02—0,05		0,02—0,05		0,2—0,3		0,4—0,5	
Ratten								
Mittelwerte . . .	95	167	331	587			895	1509
Differenz	+ 76%		+ 77%				+ 69%	
P-Wert	0,0001—0,001		0,001—0,01				0,05	

Gewichtsabnahme zu Veränderungen der Aminoxydaseaktivität in der Leber führt (Tab. 5). Nach 4tägigem Hungern hatte bei den Meerschweinchen das Körpergewicht um 21%, das Gewicht der Leber sogar um 34% abgenommen. Wie in den Versuchen mit Thyroxin und Trijodthyronin war auch bei den Hungertieren die Aktivität der Aminoxydase in den Leberextrakten deutlich erhöht, ergab aber bei Berechnung auf das Gesamtgewicht der Leber normale Werte (Tab. 2).

Tabelle 2. *Trijodthyronin* und *Nahrungsentzug* (siehe Methodik)

	Körpergewicht in g				Lebergewicht in g	
	Kontrolltiere		Trijodthyronintiere		Kontrolltiere	Trijodthyroninntiere
	Ausgangsgewicht	Endgewicht	Ausgangsgewicht	Endgewicht		
Meerschweinchen Mittelw. (7 Tiere)	310	296 (— 4%)	299	240 (— 20%)	9,76	7,70 (— 21%)
	Kontrolltiere		Hungertiere			
Meerschweinchen Mittelw. (5 Tiere)	400	415 (+ 4%)	402	317 (— 21%)	16,47	10,89 (— 34%)

Aminoxydaseaktivität der Leberextrakte

	mm^3 O_2/Std pro							
	1 g Feuchtgewicht		1 g Trockengewicht		1 mg N		Gesamtleber	
	Kontr.	Trij.	Kontr.	Trij.	Kontr.	Trij.	Kontr.	Trij.
Meerschweinchen								
Mittelwerte . . .	219	340	718	1167	10,32	15,78	2073	2540
Differenz	+55%		+62%		+53%		+23%	
P-Wert	0,02—0,05		0,05—0,1		0,3—0,4		0,4—0,5	
	Kontr.	Hung.	Kontr.	Hung.	Kontr.	Hung.	Kontr.	Hung.
Meerschweinchen								
Mittelwerte . . .	216	359	746	1153	12,98	18,25	3530	3895
Differenz	+65%		+54%		+41%		+9%	
P-Wert	0,001—0,01		0,05—0,1		0,001—0,01		0,7—0,8	

3. Beeinflussung der Dopadecarboxylaseaktivität durch Thyroxin, Trijodthyronin und Hunger

Im Gegensatz zur *Aminoxydase* war die Aktivität der *Dopadecarboxylase* in der Leber der mit Thyroxin bzw. Trijodthyronin behandelten Tiere ebenso wie bei den Hungertieren signifikant *vermindert*. Die

Signifikanz dieser Aktivitätsabnahme blieb, da die Lebergewichte stark reduziert waren, bei Berechnung auf das Gesamtgewicht der Leber nicht nur erhalten, sondern wurde erst recht deutlich (Tab. 3).

Tabelle 3. *Dopadecarboxylaseaktivität der Leberextrakte Thyroxin* (Tiere aus Tab. 1)

	mm³ CO_2/Std pro							
	1 g Feucht-gewicht		1 g Trocken-gewicht		1 mg N		Gesamtleber	
	Kontr.	Thyr.	Kontr.	Thyr.	Kontr.	Thyr.	Kontr.	Thyr.
Meerschweinchen								
Mittelwerte . . .	236	168	806	589	12,85	10,47	3236	1823
Differenz	—29%		—27%		—19%		—44%	
P-Wert	0,02—0,05		0,05—0,1		0,1—0,2		0,001—0,01	
Kaninchen								
Mittelwerte . . .	150	39	527	150	9,11	1,99	10997	2318
Differenz	—74%		—71%		—78%		—79%	
P-Wert	0,0001—0,001		0,001—0,01		0,01—0,02		0,0001—0,001	
Ratten								
Mittelwerte . . .	95	51	329	182			918	464
Differenz	—46%		—45%				—50%	
P-Wert	0,0001—0,001		0,0001—0,001				0,0001—0,001	

Trijodthyronin und Nahrungsentzug (Tiere aus Tab. 2)

	mm³ CO_2/Std pro							
	1 g Feucht-gewicht		1 g Trocken-gewicht		1 mg N		Gesamtleber	
	Kontr.	Trij.	Kontr.	Trij.	Kontr.	Trij.	Kontr.	Trij.
Meerschweinchen								
Mittelwerte . . .	252	182	863	641	12,50	10,05	2238	1448
Differenz	—28%		—26%		—20%		—35%	
P-Wert	0,05—0,1		0,02—0,05		0,05—0,1		0,02—0,05	
	Kontr.	Hung.	Kontr.	Hung.	Kontr.	Hung.	Kontr.	Hung.
Meerschweinchen								
Mittelwerte . . .	217	173	741	554	12,23	8,84	3656	1897
Differenz	—20%		—25%		—28%		—48%	
P-Wert	0,3—0,4		0,05—0,1		0,0001—0,001		0,0001—0,001	

Weitere Versuche hatten das Ziel, festzustellen, ob die Abnahme der Dopadecarboxylaseaktivität durch einen Verlust an Apoferment oder Coferment — *Pyridoxalphosphat (Py)* — verursacht war.

Bei den *Kontrolltieren* läßt sich die Aktivität der Dopadecarboxylase im Leberextrakt durch Py um ungefähr 100% steigern. Die stark verminderte Fermentaktivität der *Hungertiere* wird durch die gleiche Pymenge um mehr als 400% gesteigert, so daß sie praktisch diejenige der Kontrolltiere erreicht. Demgegenüber läßt sich die bei den *Thyroxintieren* gleichstark verminderte Aktivität der Dopadecarboxylase durch Py nur so wenig erhöhen, daß die Werte der Py-*haltigen* Ansätze noch unter denen der Py-*freien* Ansätze der Kontrolltiere liegen (Abb. 1). — Gleiche Ergebnisse wie in dem in der Abb. 1 dargestellten Versuch mit *Ratten* hatten Versuche mit Meerschweinchen.

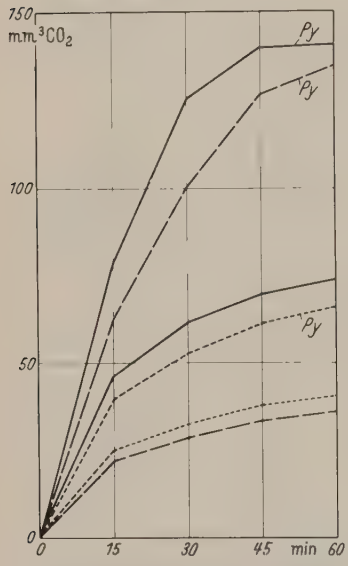


Abb. 1. *Aktivierbarkeit der Dopadecarboxylase durch Pyridoxalphosphat in Leberextrakten normaler, thyroxinvorbehandelter und hungernder Ratten.* Warburg-Apparatur: manometrische Messung der abgespaltenen CO_2 (siehe Methodik). ——— Kontrolltiere; - - - - - - Thyroxintiere — — Hungertiere: *Py* = Zusatz von 10 γ Pyridoxal-5-phosphat

Die im thyreotoxischen und im Hungerzustand gleichermaßen verminderte Aktivität der Dopadecarboxylase scheint demnach eine verschiedene Ursache zu haben: im *Hungerzustand* ist offenbar vor allem ein Mangel an *Coferment* Ursache der Aktivitätsminderung; er läßt sich durch Py beheben. *Thyroxin* führt jedoch auch zu einer Einschmelzung von *Apoferment*, so daß selbst ein Überschuß an Coferment (Py) die Aktivität kaum steigert.

Bemerkungen

1. Aminoxydase

Die Ergebnisse unserer Versuche stehen im Gegensatz zu dem Befund anderer Autoren (Burn u. Spinks), daß die Aminoxydaseaktivität der Leber durch Verfütterung von Schilddrüsenpulver *vermindert* wird, — und würden der Hypothese, die Übererregbarkeit des sympathischen Nervensystems bei Hyperthyreosen stehe in ursächlichem Zusammenhang mit einer Abnahme der Aminoxydaseaktivität und einer dadurch bedingten Wirksamkeitssteigerung der Überträgerstoffe sympathischer Nervenwirkungen, die bisherige experimentelle Grundlage nehmen.

Es ist aber zu berücksichtigen, daß für den inaktivierenden Abbau dieser Überträgerstoffe durch die Aminoxydase und damit indirekt für deren Wirksamkeit vielleicht weniger das Ferment der Leber — oder anderer Organe, wie Niere und Darm — von Bedeutung ist als vielmehr die in den Erfolgsorganen im Bereich der sympathischen Nervenendigungen befindliche Aminoxydase. Über deren etwaige Beeinflussung

durch Schilddrüsenhormone sagen weder die Versuche der englischen Autoren noch unsere eigenen etwas aus. — Andererseits sprechen neuere Untersuchungen über die Beeinflussung der Adrenalin- und Nor-adrenalinwirkungen durch Hemmstoffe der Aminoxydase — Marsilid (1-Isonicotinyl-2-isopropylhydrazid), Methylenblau — dagegen, daß der Aminoxydase *überhaupt* größere Bedeutung für den Abbau der „Sympathine" zukommt, da eine Hemmung des Fermentes zwar die Wirkungen einfacher Phenyl- und Indolylalkylamine, z. B. des Tyramins und Tryptamins deutlich verstärkt, nicht aber diejenigen des Adrenalins und Nor-adrenalins (Zeller u. Mitarb., Schayer, v. Euler, Balzer und Holtz). Für die Inaktivierung dieser Brenzkatechinderivate sind offenbar andere Fermentreaktionen — Oxydation der ringständigen OH-gruppen, Paarung mit Schwefel- und Glucuronsäure — wichtiger.

2. Dopadecarboxylase

Im Gegensatz zur Aminoxydase kam es in unseren Versuchen nach Thyroxinbehandlung und im Hungerzustand zu einer signifikanten *Abnahme* der Dopadecarboxylaseaktivität in der Leber. Wenn wir auch die wichtigste physiologische Aufgabe dieses Fermentes, das wir kürzlich auch in sympathischen Nerven und Ganglien nachweisen konnten (Holtz u. Westermann), darin erblicken, Muttersubstanz (Oxytyramin) für die Biosynthese der „Sympathine" zu liefern, so würde eine Abnahme seiner Aktivität, wenn sie nicht nur das in der Leber, sondern auch das in den Nerven vorhandene Ferment beträfe, eher zu einer Aktivitäts*abnahme* als zu einer für die Hyperthyreose charakteristischen *Zunahme* der Aktivität der sympathischen Nerven führen müssen.

Besonderes Interesse verdient vielleicht der verschiedene *Mechanismus*, der im Hungerzustand und bei Thyroxinbehandlung zur Abnahme der Dopadecarboxylaseaktivität führt. Im ersten Fall ist vornehmlich ein Mangel an *Coferment* — Pyridoxalphosphat bzw. Vitamin B_6 —, im zweiten Fall auch ein Mangel an *Apoferment* die Ursache. Ähnlich wie bei unseren Thyroxintieren kam es in Versuchen Blaschkos bei Ratten, die längere Zeit eine B_6-Mangeldiät erhalten hatten, zu einer Abnahme der Aktivität der Dopadecarboxylase in der Leber, die sich durch Pyridoxalphosphat nicht vollständig restituieren ließ. Unerklärt bleibt, weshalb es unter der Thyroxinwirkung für die *Dopadecarboxylase* zu einem Verlust bzw. einer Einschmelzung von Apoferment kommt, nicht aber für die *Aminoxydase*.

Summary

1. In liver extracts of rabbits, guinea pigs and rats the activity of *mono-aminooxydase* was increased or not significantly altered by treating the animals with *thyroxine* resp. *trijod-thyronine* or by starving them.

The bodyweight and the weight of the liver was diminished to 20—30%. These results do not support the view that in hyperthyreosis the hyperactivity of the sympathetic nervous system or of the sympathetic transmitters respectively is caused by an inhibition of aminooxydase.

2. The activity of *l-dopadecarboxylase* in liver extracts of thyroxine-treated or starved animals was significantly *decreased*. In liver extracts of starved animals by addition of pyridoxalphosphate — the codecarboxylase — it was possible to restore the activity to the level of the controls which is not true for the liver extracts of the thyroxine-treated animals.

Literatur

Balzer, H., u. P. Holtz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 547 (1956) — Blaschko, H., C. W. Carter, J. R. P. O'Brien and G. H. Sloane Stanley: J. of Physiol. **107**, 18 P (1948). — Burn, J. H., and H. T. Marks: J. of Physiol. **60**, 131 (1925). — Burn, J. H., and A. Spinks: Brit. J. Pharmacol. **7**, 93 (1952). — v. Euler, U. S., u. S. Hellner-Björkman: Acta physiol. scand. (Stockh.) **33** (Suppl. 118), 21 (1955). — v. Euler, U. S., u. B. Zetterström: Acta physiol. scand. (Stockh.) **33** (Suppl. 118), 26 (1955). — Grab, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 16 (1952). — Holtz, P., u. E. Westermann: Naturwissenschaften **42**, 647 (1955); Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **227**, 538 (1956). — Klein, J. R.: J. of Biol. Chem. **131**, 659 (1939). — Kroneberg, G., u. F. Hüter: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 344 (1952). — Schayer, R. W., and R. C. Smiley: J. of Biochem. **202**, 425 (1953). — Zeller, E. A., u. Mitarb.: Proc. Soc. Exper. Biol. a Med. **84**, 699 (1953).

Prof. Dr. P. Holtz, Frankfurt/M., Pharmakol. Institut d. Univ.,
Ludwig-Rehn-Str. 14

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 331—339 (1956)

Aus dem Gewerbehygienisch-Pharmakologischen Institut der Badischen Anilin- und Sodafabrik AG., Ludwigshafen/Rhein. (Leiter: Prof. Dr. med. H. Oettel)

Zur Frage der antiphlogistischen Wirkung von Azulenen

II. Mitteilung*

Von

H. Oettel und G. Wilhelm-Kollmannsperger

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 28. Dezember 1955)

In einer 1. Mitteilung wurde von uns über die Prüfung einiger natürlicher und synthetischer Azulene an der Senfölchemosis des Kaninchens berichtet. Im Gegensatz zu fast allen bisherigen Azulenprüfern konnten wir an diesem Testobjekt auch für die als antiphlogistisch wirksam geltenden natürlichen Azulene (Chamazulen und Guajazulen) in ausgedehnten Reihenuntersuchungen — selbst bei langdauernder Behandlung mit maximal verträglichen Konzentrationen der betreffenden Präparate — keine eindeutige entzündungshemmende Wirkung nachweisen.

Die Senfölchemosis des Kaninchens erwies sich also nach unseren Erfahrungen ebenso wie die orientierend von uns geprüfte Senfölchemosis des Meerschweinchens als Testmethode zur pharmakologischen Wertbestimmung von Kamillenzubereitungen bzw. Azulenen als ungeeignet.

Neben der Senfölchemosis wurde bisher zur Testung azulenhaltiger Präparate am häufigsten die *Ultravioletterythementzündung der Haut* herangezogen. Als Testobjekt diente hierbei im Tierversuch meist die *Ratte* (Heubner u. Grabe, Heubner u. Albath, Hesse, Altner u. Zeppmeisel) und in je einem Falle das *Schwein* (Heubner u. Grabe) und das *Kaninchen* (Hesse, Altner und Zeppmeisel). An Ultravioletterythemen der *menschlichen Haut* untersuchten Arnold, Heubner und Grabe, Heubner u. Albath, Albath, Pommer, Kagelmacher und Bosch.

Wir haben zur Untersuchung azulenhaltiger Präparate die Ultravioletterythementzündung von Ratten und Kaninchen benutzt und mit Hilfe dieser beiden Methoden folgende Produkte auf ihre antiphlogistische Wirkung untersucht:

1. Oleum Chamomillae aeth. germanic. Azulengehalt: 2,5%.
2. Guajazulen; Azulengehalt: 95—100%.
3. Azulensalbe des Handels; Azulengehalt: 10 mg% 1-Isopropyl-5-methylazulen in indifferenter Vaseline-Lanolin-Salbengrundlage.

* Über die Ergebnisse der Versuche wurde bereits auf dem Pharmakologenkongreß in Bonn 1953 kurz berichtet (Kollmannsperger u. Oettel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 222, 228 (1954).

4. Kamillensalbe des Handels; Azulengehalt nicht angegeben.

5. 4 synthetische Azulene der Badischen Anilin- und Sodafabrik Ludwigshafen am Rhein.

Versuche

Um als mögliche Fehlerquelle den Einfluß anderer Medikamente bei unseren Untersuchungen auszuschalten, führten wir im Gegensatz zu den bisherigen Azulenprüfern alle Bestrahlungsversuche an *nicht narkotisierten* Tieren durch, die mittels einer besonders konstruierten Halteapparatur während der Bestrahlung exakt fixiert wurden.

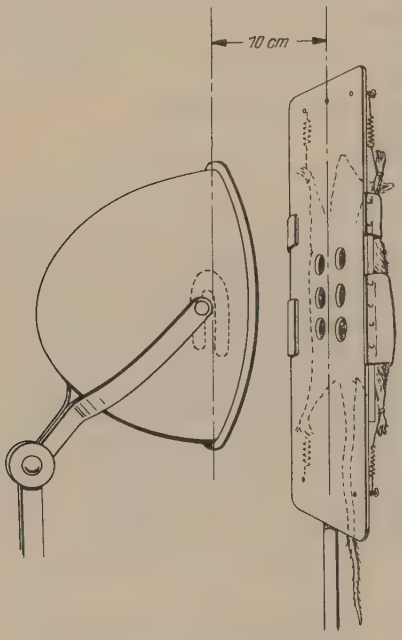


Abb. 1. Apparatur zur Fixierung von Ratten bei der Ultravioletbestrahlung

I. Ultravioletentzündung an der Ratte

1. Versuchstechnik. *a) Bestrahlung.* Ratten wurden mit einer Haarschneidemaschine auf der Bauchseite geschoren und mit Spiralfedern, die an den Pfoten befestigt wurden, so auf ein Holzbrett aufgespannt, daß die Bauchseite der Tiere dem Brett zugewandt war (s. Abb. 1). Eine breite Gummimanschette, die auf einer Seite mit Nägeln an dem Brett befestigt war, über den Rücken der Tiere gespannt und auf der anderen Seite des Brettes mit Metallklammern fixiert wurde, machte eine Bewegung der Tiere während der Bestrahlung unmöglich. Auf der der Bestrahlungsquelle zugewandten Seite war auf dem Brett eine dünne Leichtmetallplatte befestigt, die das Holzbrett nach oben und unten um je 5 cm überragte und durch Ableiten der Wärme in die Luft eine Erhitzung des Brettes während der Bestrahlung verhinderte. Im Abstand von 1 cm waren in dem Brett 2 Lochreihen ausgespart mit je 3 oder 4 kreisrunden Löchern von 1 cm Durchmesser.

Das Brett wurde im Abstand von 10 cm parallel zur senkrecht stehenden Haube einer Quecksilberquarzlampe an einem Stativ befestigt und die einzelnen Hautstellen durch Einsetzen von Gummistopfen in die Löcher nach bestimmten Zeiten verschieden lang bestrahlt (Kombination von Licht- und Wärmewirkung!). Die Bestrahlungsdauer, die für 2 in gleicher Höhe liegende Hautstellen jeweils gleich war, betrug 30, 60 und 120 sec (6 Reizstellen/Tier). Kürzere Bestrahlungszeiten (15 sec) sind, wie Vorversuche an 10 Ratten ergeben hatten, infolge ihrer zu schwachen Wirkung zur Auslösung eines exakt zu beurteilenden Entzündungsreizes nicht geeignet (bei einigen Tieren keinerlei Reaktion, bei anderen nur kurzdauernde, leichte Hautverfärbung bzw. angedeutete Schuppung).

Die beschriebene Bestrahlungsvorrichtung für Ratten bietet gegenüber den bisher üblichen Methoden (Heubner u. Grabe, Heubner u. Albath, Schikorr) den Vorteil, nicht narkotisierte Tiere während der Bestrahlung exakt und schonend

fixieren zu können, wobei das zum Festbinden der Tiere dienende Holzbrett gleichzeitig eine Abdeckung des ganzen Körpers der Ratten (mit Ausnahme der zu bestrahlenden Hautstellen) gegenüber der Strahleneinwirkung ermöglicht[1].

b) Behandlung. Eine Behandlung der Bestrahlungsstellen *eines* Tieres mit *verschiedenen* Azulenen bzw. Kontrollzubereitungen, wie sie von HEUBNER u. Mitarb. angegeben wird, ist nach unseren Erfahrungen wegen der relativ kleinen Hautfläche und der Lebhaftigkeit der Tiere ebenso wenig exakt durchführbar wie die Beschränkung der Behandlung mit *einem* Azulenpräparat auf die Bestrahlungsstellen einer Bauchseite unter Verwendung der anderen Bauchseite als Kontrolle. Wir haben daher nach einigen Vorversuchen grundsätzlich stets eine Reihe von Tieren als Versuchsgruppe und weitere Tiere als Kontrollgruppe verwendet unter Behandlung der *ganzen* bestrahlten Hautfläche mit den betreffenden azulenhaltigen Präparaten bzw. Lösungsmitteln oder Salbengrundlagen.

Die Behandlung wurde folgendermaßen durchgeführt: Sofort nach der Bestrahlung sowie am darauffolgenden Tag wurden die Ratten jeweils 4 Std lang in Spezialwannen (von E. SCHÜTZ in unserem Institut entwickelt) fixiert, in denen sich je 1 cm^3 der zu untersuchenden Lösungen von Ol. Chamomillae, Guajazulen oder Olivenöl befand; oder es wurden ihnen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 4 Std lang Verbände mit Kamillensalbe, Azulensalbe oder Ungt.molle angelegt, wobei die Tiere in zu diesem Zweck konstruierten Drahtkäfigen fixiert wurden.

2. Auswertung. Die Ergebnisse der Versuche wurden zunächst auf Grund einer täglichen Kontrolle der Bestrahlungsstellen bei den einzelnen Tieren in Punkten beurteilt. Da jedoch die beobachteten entzündlichen Veränderungen ein sehr gleichmäßiges Bild boten und nicht nur bei Versuchs- und Kontrolltieren, sondern auch bei verschiedenen Bestrahlungszeiten sich nicht wesentlich unterschieden (1. Tag: meist o. B.; 2.—4. Tag: weiße Verfärbung, gelegentlich verbunden mit einer Schwellung; 5.—7. Tag: Krustenbildung, manchmal auch nur Schuppung; zwischen dem 7. und 10. Tag Abheilung, häufig unter Bildung oberflächlicher Narben), genügte zur exakten quantitativen *Auswertung* der Versuche die Zeitdauer in Tagen bis zur Abheilung der entzündeten Hautstellen. Da bei jedem Tier 2 Hautstellen gleich lange bestrahlt waren, wurde als Heilungsdauer jeweils der Mittelwert zwischen den Heilungszeiten für gleich lange Bestrahlung angegeben, die durchschnittlich um einen halben bis einen Tag differierten.

3. Streuung der Methode. Zur Feststellung der Streuung der Methode und zur Kontrolle einer etwaigen Wirkung des Lösungsmittels bzw. der Salbengrundlage wurde eine 3 Faktoren-Varianzanalyse durchgeführt[2] unter Berücksichtigung der Tiergruppen, der Einzeltiere und der Bestrahlungszeiten. Es ergaben sich hinsichtlich der Zeitdauer bis zur

[1] Die beschriebene Apparatur hat sich uns auch bei der Austestung von Lichtschutzmitteln gut bewährt, wobei die für die Bestrahlung vorgesehenen Hautstellen der rechten Bauchseite jeweils mit dem zu prüfenden Lichtschutzmittel, die der linken Seite mit dem entsprechenden Lösungsmittel bzw. der Salbengrundlage in dünner Schicht bedeckt und anschließend der Bestrahlung ausgesetzt wurden.

[2] Für die Durchführung der Varianzanalyse möchten wir an dieser Stelle Herrn Dr. med. W. FÖRSTER unseren Dank aussprechen.

Abheilung keine signifikanten Unterschiede zwischen der unbehandelten, der mit Olivenöl und der mit Ungt.molle behandelten Kontrollgruppe (s. Tab. 1). Zum Vergleich mit den behandelten Tieren und damit zur Beurteilung einer etwaigen entzündungshemmenden Wirkung konnten daher sämtliche Kontrollgruppen (insgesamt 49 Tiere) zusammengefaßt werden. Es ergaben sich zwar signifikante Unterschiede in der jeweiligen Heilungsdauer nach verschiedenen Bestrahlungszeiten, doch waren diese Unterschiede trotz der großen Differenz der Bestrahlungszeiten (geometrische Reihe) erstaunlich gering. Es ist also bei der gewählten Versuchsanordnung kaum möglich, oberhalb der Reizschwelle durch

Tabelle 1. *Ultravioletten tzündung an der Ratte*
Kontrollversuche

Behandlung der Kontrollgruppe	Tierzahl	Durchschnittl. Heilungsdauer in Tagen bei verschiedenen Bestrahlungszeiten		
		30 sec	60 sec	120 sec
Keine	20	7,1	8,2	9,5
Olivenöl	15	7,9	8,6	9,3
Ungt. molle	14	7,0	8,5	9,8
Zusammenfassung der Kontrollen	49	7,3 $\sigma = \pm 1{,}4$	8,4 $\sigma = \pm 1{,}2$	9,5 $\sigma = \pm 1{,}4$

Tabelle 2. *Beeinflussung der Ultravioletten tzündung an der Ratte*

Produkt	Konz. des Produktes %	Azulengehalt d. appliziert. Lösung bzw. Salbe %	Tierzahl	Durchschnittl. Heilungsdauer in Tagen bei verschiedenen Bestrahlungszeiten		
				30 sec	60 sec	120 sec
Kamillensalbe	Originalsalbe	nicht angegeben	10	8,4	9,9	11,4
Azulensalbe	Originalsalbe	0,01	10	8,8	9,9	11,6
Oleum Chamomillae aeth. germanicum . .	10	0,25	5	8,2	9,8	9,8
	20	0,5	5	9,2	10,1	9,9
	50	1,25	5	7,4	7,6	8,4
Guajazulen	10	10	4	7,3	8,1	9,8
	50	50	9*	6,6	8,3	9,1

* Bei 5 von 9 Tieren trat innerhalb der ersten 4—5 Tage nach starker Gewichtsabnahme und anhaltendem Durchfall (toxische Wirkung) der Tod ein. Sektionsbefund: Starke Blaufärbung der Haut und sämtlicher Organe. Trotzdem die gleichen Entzündungserscheinungen wie bei den Kontrollen. Bei den überlebenden Tieren ebenfalls Durchfall und starke Gewichtsabnahme. Die in der Tabelle enthaltenen Mittelwerte betreffen die 4 überlebenden Tiere.

verschieden lange Bestrahlungsdauer „dosierte" Entzündungsreize zu setzen, wie SCHIKORR angibt und wie es auch von uns ursprünglich beabsichtigt worden war.

4. Ergebnis. (Einzelbefunde s. Tab. 2). Trotz einer intensiven Behandlung mit Azulenen in einem Dosierungsbereich von den klinisch üblichen, niedrigen Konzentrationen (Kamillensalbe, Azulensalbe) bis zu den höchsten, bereits zur resorptiven Vergiftung führenden Konzentrationen konnte der Verlauf der Ultraviolettentzündung in keinem Falle günstig beeinflußt werden. Heilungsdauer und Stärke der Entzündung (Schorfbildung) waren bei den mit Azulen behandelten Versuchs- und bei den mit Olivenöl oder Ungt. molle behandelten bzw. unbehandelten Kontrolltieren stets gleich.

II. Ultraviolettentzündung am Kaninchen

Um die Wirkung azulenhaltiger Präparate auch am *selben* Tier durch Vergleich der unbehandelten und azulenbehandelten Bestrahlungsstellen untersuchen zu können, wurden die Reihenversuche an der Ratte durch orientierende Versuche am Kaninchen ergänzt, die allerdings infolge der kleineren Tierzahlen eine statistische Auswertung nicht ermöglichten.

1. Versuchstechnik. Bei nicht narkotisierten, auf der Bauchseite geschorenen Kaninchen wurde in gleicher Weise wie bei den Ratten durch Bestrahlen mit einer Quecksilberquarzlampe im Abstand von 10 cm eine Entzündung der Bauchhaut erzeugt. Das zum Fixieren der Tiere während der Bestrahlung verwendete, mit 2 Lochreihen versehene Holzbrett entsprach dem unter Nr. I, 1a beschriebenen, zum Fixieren der Ratten konstruierten Brett (s. Abb. 1), war nur entsprechend größer. Die Bestrahlungsdauer für 2 in gleicher Höhe liegende Hautstellen (Versuchs- und Kontrollseite) war jeweils gleich.

Die Bestrahlungsstellen der rechten Bauchseite jedes Tieres wurden mit öligen Lösungen von Ol. Chamomillae und Guajazulen oder Azulensalbe behandelt, während die Bestrahlungsstellen der linken Seite als Kontrolle dienten und unbehandelt blieben oder mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt wurden. Die Behandlung wurde durch wiederholtes vorsichtiges Einreiben oder durch Anlegen von Verbänden sofort nach der Bestrahlung sowie an den darauffolgenden Tagen (unter Fixierung der Tiere) durchgeführt.

2. Auswertung. Da wegen der meist sehr langsamen Abheilung der Entzündung nicht alle Tiere bis zur Symptomfreiheit beobachtet wurden und die Heilungsdauer daher nicht immer angegeben werden konnte, wurden die Versuchsergebnisse lediglich auf Grund einer teils täglich, teils in größeren Abständen vorgenommenen Kontrolle der einzelnen Bestrahlungsstellen in Punkten beurteilt.

3. Ergebnis. (Einzelbefunde s. Tab. 3—5). Wie in den Bestrahlungsversuchen an Ratten war die Intensität der Entzündungserscheinungen nach verschiedenen Bestrahlungszeiten (15 sec bis 16 min) nicht wesentlich verschieden: Im allgemeinen wurde kurz nach der Bestrahlung keine sichtbare Veränderung, vom 2.—6. Tag eine Rötung (teilweise mit Schwellung)

Tabelle 3. *Beeinflussung der Ultraviolettentzündung am Kaninchen.* Oleum chamomillae aeth. germanic.

Tier Nr.	Konz. des Kamillenöls	Azulengehalt der appl. Lsg.	Behandlungsschema	Bestrahlungszeit in min (8 Bestr.-stellen pro Tier; bei 2 Stellen/Tier gleiche Bestr.-zeit)	Versuchstag	Befund	
						Vers.-seite (re.)	Kontr.-seite (li.)
363	konz.	2,5%	*Rechts (Versuchsseite):* Sofort nach der Bestrahlung werden für 20 Std mit Kamillenöl getränkte Leinenläppchen (2,5 cm/2,5 cm) auf die Bestrahlungsstellen aufgebunden. *Links (Kontrollseite):* Keine Behandlung	16, 8, 4 u. 2	2.—5. 9.—15. 23.	(+) ++++ 0	+ ++++ 0
240				16 und 8	2.—7. 9.—15. 23.	+ ++++ 0	(+) ++++ 0
				4 und 2	2.—7. 9.—12. 15. 23.	+ (++++) 0 0	(+) (++++) (++++) 0
364				16, 8, 4 u. 2	2.—5. 7.—12.	(+) ++++	(+) ++++
547	10%ig in Olivenöl	0,25%	*Rechts (Versuchsseite):* Sofort nach der Bestrahlung werden für 20 Std mit Kamillenöl getränkte Leinenläppchen auf die Bestrahlungsstellen aufgebunden. 2. Tag: Im Abstand von je 1 Std wird die re. Bauchseite 4mal 5 min lang vorsichtig mit Kamillenöl eingerieben. *Links (Kontrollseite):* Die gleiche Behandlung mit Olivenöl	2, 1 und ½	3. 5. 8.—12.	++ ++++ ++++	++ ++++ ++++
				¼	3.—6. 8.	(+) 0	(+) 0
341				2, 1, ½ u. ¼	3.–5. 6.—8. 12.—14.	(+) (++++) +++	(+) (++++) +++

Zeichenerklärung: 0 Kein path. Befund bzw. Abheilung unter Narbenbildung; + Rötung; ++ Rötung und Schwellung; +++ Schuppenbildung; ++++ Krusten- bzw. Schorfbildung; ( ) Die durch die Zahl der Kreuze bezeichneten Veränderungen sind nur leicht ausgeprägt.

Tabelle 4. *Beeinflussung der Ultraviolettentzündung am Kaninchen.* Guajazulen (Azulengehalt: 95—100%)

Tier Nr.	Konz. in Erdnußöl	Behandlungsschema	Bestrahlungszeit in min (6 Bestr.stellen pro Tier; bei 2 Stellen/Tier gleiche Bestr. zeit)	Versuchstag	Befund	
					Versuchsseite (re.)	Kontrollseite (li.)
826	10%	*Rechts (Versuchsseite):* 1. Tag: Sofort nach der Bestrahlung wird jede Bestrahlungsstelle rechts 5 min lang vorsichtig mit den betr. Azulenlösung eingerieben.	4 min, 2 min und 1 min	1.	0	0
				2.	(+)	(+)
				3.—7.	(++++)	(++++)
				14.	0	0
827		2. Tag: Im Abstand von etwa 4 Std wird 2mal die gleiche Behandlung wie am Vortag durchgeführt.		1.	0	0
				2.—3.	(+)	(+)
				10.	+++	+++
516	1%	*Links (Kontrollseite):* Die gleiche Behandlung mit Erdnußöl		1.	0	0
				2.	(+)	(+)
				3.—7.	(++++)	(++++)
				14.	0	0
689	0,1%			1.	0	0
				2.	(++)	(++)
				3.—7.	(++++)	(++++)
				14.	0	0

Zeichenerklärung: siehe Tab. 3.

Tabelle 5. *Beeinflussung der Ultraviolettentzündung am Kaninchen.* AZULENSALBE (Zusammensetzung: 10 mg-% 1-Isopropyl-5-methylazulen in indifferenter Vaseline-Lanolin-Salbengrundlage)

Tier Nr.	Behandlungsschema	Bestrahlungszeit in min*	Versuchstag	Befund: Versuchsseite (re.)	Befund: Kontrollseite (li.)
	Rechts (Versuchsseite):	16 und 2	2.—3.	(+)	(+)
374	1. Tag: Sofort nach der Bestrahl. wird jede Bestr.-stelle (re.) 3 min lang vorsichtig mit Azulensalbe eingerieben.		4.—5.	(+)	+
			10.	(++++)	(++++)
			18.	0	0
			2.—3.	(+)	(+)
			4.—5.	(+)	+
	2.—3. Tag: Im Abstand von 4 Std. 2× täglich die gleiche Behandlung.	8 und 4	10.	(++++)	(++++)
			18.	+++	++++
			24.	0	0
	4. Tag: In 1 stündigen Abständen 6mal die gleiche Behandlung.		2.—3.	(+)	(+)
375		16, 8, 4 und 2	4.—5.	++	+
			10.—18.	+++	+++
			24.	0	0
	Links (Kontrollseite):	16, 8, 4 und 2	2.—5.	+	+
384	Keine Behandlung.		18.	++++	++++
			24.	0	0
			2.	+	+
			3.—4.	++	(++)
		16 und 8	9.	++++	++++
			17.	+++	(++++)
			23.	0	0
			2.	+	+
388			3.—4.	++	(++)
		4	9.	++++	++++
			17.	0	(++++)
			23.	0	0
			2.	+	+
		2	3.—4.	++	(++)
			9.	++++	++++
			17.	0	0
	Rechts (Versuchsseite):		2.—4.	(+)	(+)
153	Messerrückendick mit Azulensalbe bestrichene Leinenläppchen (2,5 cm/2,5 cm) werden sofort nach d. Bestr. für 15 Std (über Nacht) auf die Bestr.stellen rechts aufgebunden. In der folgenden Nacht gleiche Behandlung.	16, 8, 4 und 2	6.	++	(+)
			10	++++	++++
			24.	+++	+++
			2.—5.	+	+
309			8.—12	++++	++++
			18.	0	0
	Links (Kontrollseite): Keine Behandlung.				

Zeichenerklärung: s. Tab. 3

* = 8 Bestrahlungsstellen/Tier; bei 2 Stellen/Tier gleiche Bestrahlungszeit.

und anschließend eine Krustenbildung der bestrahlten Hautstellen beobachtet, die meist nach 14 Tagen bis 3 oder 4 Wochen abgeheilt war.

Diese Entzündungserscheinungen konnten durch eine sofort nach der Bestrahlung einsetzende Behandlung mit Azulenen weder verhindert noch ihr Verlauf eindeutig beeinflußt werden.

In gleicher Weise wie Ol. Chamomillae, Guajazulen, Kamillensalbe und Azulensalbe wurden 4 synthetische Azulene der Badischen Anilin- und Sodafabrik an der Ultraviolettentzündung von 16 Ratten und 9 Kaninchen untersucht. Das Ergebnis der Prüfungen war ebenfalls negativ.

Über die entzüdungsdämpfende Wirkung von Kamille und Azulen beim *Menschen* können diese *Tierversuche* nichts aussagen, sie zeigen nur, daß auch die Ultraviolettentzündung der Ratte und des Kaninchens — ebenso wie die Senfölchemosis des Kaninchens und Meerschweinchens — zur pharmakologischen Wertbestimmung von Kamillenzubereitungen ungeeignet ist.

Zusammenfassung

1. Die Ultraviolettentzündung des Rattenbauches, gebräuchlich zum Nachweis der antiphlogistischen Wirkung von Azulenen, besitzt eine relativ geringe individuelle Streuung. Bei verschieden langer Bestrahlungsdauer ist die Entzündungsintensität oberhalb der Reizschwelle nicht wesentlich verschieden.

2. Trotz intensiver Behandlung mit natürlichen und synthetischen Azulenen konnte der Verlauf der Ultraviolettentzündung in keinem Falle eindeutig günstig beeinflußt werden.

3. Grundsätzlich die gleichen Befunde ergaben ergänzende Versuche an der Ultraviolettentzündung des Kaninchens.

4. Beide Methoden sind also zur pharmakologischen Wertbestimmung von Kamillenzubereitungen bzw. Azulenen sowie zur Klärung der Frage nach dem wirksamen Bestandteil der Kamille ungeeignet.

Frl. Mechthild Neumann sei an dieser Stelle für ihre Assistenz bei der Durchführung der Versuche besonders gedankt.

Literatur

Albath, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **193**, 619 (1939). — Arnold, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **123**, 129 (1927). — Bosch, G.: Diss. München 1948. — Heubner, W., u. W. Albath: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **192**, 384 (1939). — Heubner, W., u. F. Grabe: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **171**, 329 (1933). — Hesse, E., W. Altner u. L. Zeppmeisel: Klin. Wschr. **15**, 1485 (1936); zit. nach Heubner u. Albath. — Kagelmacher, E.: Diss. München 1950. — Kollmannsperger, G., u. H. Oettel: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 228 (1954). — Pommer, C.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **199**, 74 (1942). — Schikorr, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **168**, 190 (1932). — Schütz, E.: Unveröffentlichte Versuche.

Prof. Dr. H. Oettel, Gewerbehygienisch-Pharmakol. Institut der Badischen Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen/Rh.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 340—346 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Die Bedeutung der Histaminfreisetzung durch Compound 48/80, Dextran und Eiereiweiß für die Ödementstehung bei der Ratte

Von

MARTIN KRAMER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. Dezember 1955)

In der vorangegangenen Mitteilung wurde auf Grund einer verschiedenen pharmakologischen Beeinflußbarkeit festgestellt, daß Dextran- und Eiklar-Hyperergie der Ratte eine verschiedene Pathogenese haben müssen. Da von den meisten Autoren die „Histamintheorie" für die Genese dieser anaphylaktischen Reaktionen vertreten wird, war es notwendig, die Beziehungen der Histaminfreisetzung zur Ödementstehung zu untersuchen.

Die Eiklarhyperergie mit ihren Symptomen (Hyperämie, Ödeme der Pfoten und Schnauzen, Pruritus) wurde von PARKER u. PARKER (1924) und von SELYE (1937) erstmalig beschrieben. LEGER u. MASSON (1948), HALPERN u. BRIOT (1949, 1950, 1952), R. MEIER u. Mitarb. zeigten eine weitgehende Hemmbarkeit dieser Symptome durch Antihistaminica. LEGER u. MASSON konnten (1948) beweisen, daß die hitzestabile Proteinfraktion des Eiereiweises, Ovomucoid, die hyperergische Reaktion der Ratte auslöst. SCHACHTER u. TALESNIK fanden schließlich, daß Eiereiweiß an der durchströmten Katzenhaut und im Serum nicht sensibilisierter Katzen oder Ratten Histamin freisetzt. Diese Wirkung an Katzen ging nach kurzem Kochen des Eiereiweißes verloren, an Ratten blieb die Wirkung erhalten. An Hunden setzte Eiereiweiß kein Histamin frei.

Die gleiche hyperergische Reaktion wie nach Eiereiweiß wurde erstmalig von WOORHEES, BAKER u. PULASKI nach Dextran an Ratten beobachtet. Ihre Hemmbarkeit durch verschiedene Antihistaminica wurde von HALPERN u. BRIOT, sowie MORRISON, RICHARDSON u. BLOOM festgestellt. HAHN u. WELLMANN fanden 1952, eine starke Vermehrung von Histamin nach Dextranapplikation im Rattenserum nicht dagegen im Hundeserum. Ferner konnten HALPERN u. BRIOT ungefähr gleichzeitig eine Histaminfreisetzung durch Dextran aus Hautstückchen von Ratten in vitro nachweisen. HAHN, LANGE u. GIERTZ, sowie HALPERN, BRIOT u. NEVEU untersuchten die Bedeutung des Anaphylatoxins für die Histaminfreisetzung, nachdem ROCHA E SILVA auf die Anaphylatoxinbildung im Rattenserum hingewiesen und die Möglichkeit erörtert hatte, daß die Histaminfreisetzung durch das gebildete Anaphylatoxin erfolgen könne. Sowohl HAHN wie auch HALPERN wiesen experimentell einwandfrei nach, daß die Histaminfreisetzung nicht über das Anaphylatoxin erfolgt.

Außer den genannten Substanzen Dextran und Ovomucoid gibt es noch viele andere, die als „Histamin-Liberator" bekannt sind. So z. B.

d-Tubocurarin (Anrep u. Mitarb.), einfache Diamine und Diamidine sowie Morphin (McIntosh u. Paton), ferner das Alkaloid Sinomenin (Mayeda), das chemisch dem Morphin nahesteht und schließlich eine unter dem Namen Compound 48/80 bekannte Substanz, erhalten durch Kondensation von p-methoxyphenyl-äthyl-methylamin mit Formaldehyd (Paton). Diese Substanz ist bezüglich der Histaminfreisetzung am wirksamsten (Feldberg) und im Zusammenhang mit Dextran und Eieralbumin interessant, weil sie ebenfalls Ödeme der Pfoten und Schnauzen bei Ratten hervorruft.

Feldberg u. Miles konnten an Meerschweinchen, Hunden, Kaninchen und Mäusen zeigen, daß nach Compound 48/80 die Zeichen einer gesteigerten Capillarpermeabilität überall da auftraten, wo der Histamingehalt der Haut am größten war. Feldberg u. Talesnik konnten die Haut von Ratten durch chronische Behandlung mit Compound 48/80 fast vollständig an Histamin verarmen. Von 5 Ratten die 4 Tage lang mit Compound 48/80 behandelt waren, bekamen nach i. p. Injektion von Ovalbumin nur 3 Tiere Ödeme und zwar nur an den Pfoten. Bei längerer Vorbehandlung und zwar von 11—13 Tagen mit insgesamt 37 oder 41 mg/kg Compound 48/80 bekam nach Eiereiweiß keine von 10 Ratten sichtbare Zeichen von Ödemen.

Alle zitierten Befunde sprechen sehr für die ursächliche Bedeutung des Histamins bei der Ödementstehung. Dagegen spricht lediglich, daß sowohl das Eiklarödem (Halpern u. Briot) als auch das Dextranödem (Morrison u. Mitarb.) nicht durch alle Antihistaminica hemmbar ist. Bei beiden Ödemarten ist Phenergan wirksam, beim Dextranödem außerdem noch Thephorin. Ausgesprochen spezifische Antihistaminpräparate wie Pyribenzamin und Benadryl dagegen sind beim Dextranödem unwirksam. Das Phenergan hat keine ausschließliche Antihistaminwirksamkeit, sondern wirkt ferner stark anticholinergisch und zentral sedativ. Interessant ist, daß eine dem Phenergan nahe verwandte Substanz N-3′-Dimethylaminoprophyl-3-chlorphenothiazin (Megaphen) eine noch stärkere Hemmwirkung auf beide Ödemarten besitzt, obgleich sie nur geringe Antihistaminwirkung hat (Courvoisier u. Mitarb.; Kramer).

Zur Klärung dieser Fragen wurde die Histaminverarmung der Rattenpfotenhaut nach verschieden langer chronischer Behandlung durch intraperitoneale Injektionen von Dextran, Eiereiweiß und Compound 48/80 ermittelt, sowie gleichzeitig die Prozentzahl der mit Ödemen reagierenden Tiere registriert. Die Ödemintensität, die bei intraperitonealer Injektion ohnehin nur geschätzt werden kann, blieb bei diesem Verfahren unberücksichtigt.

Methodik

Zur Histaminbestimmung wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet und die Pfotenhaut abgezogen, die nach Wägung in 10 ml 0,02 n HCl (in einem Homogenisator) homogenisiert wurde. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem Verfahren von Feldberg u. Talesnik, indem das Homogenisat 1 min gekocht und kurz vor der biologischen Auswertung am Blutdruck der atropinisierten Katze oder

am isolierten Meerschweinchendarm neutralisiert wurde. Die Darmkontraktionen oder der Blutdruckabfall waren jeweils durch Neo-Bridal hemmbar.

Bei den Versuchen mit Compound 48/80 wurden 60 Tieren am 1. Tag 1 mg, an den beiden folgenden Tagen 2 mg und den weiteren Tagen 4 mg/kg injiziert. Eine Gruppe von 15 Tieren bekam eine Woche lang täglich 2×4 mg/kg Compound 48/80 und dann wieder 1×4 mg. Von den insgesamt 60 Tieren wurden nach verschiedenen Zeitabständen mehrere Tiere zur Histaminbestimmung entnommen und getötet, einige gingen im Verlauf der Behandlung zugrunde, so daß am 30. Tag nur noch 14 Tiere im Versuch waren.

Bei den Dextranversuchen wurden 46 Tieren täglich 300 mg/kg Macrodex intraperitoneal injiziert. Die Tierzahl betrug am 18. Tag 22. Bei den Eiklarversuchen reduzierte sich die Tierzahl von 23 zu Beginn bis auf 12 am 18. Tag. Die Behandlungsdauer erstreckt sich bei den restlichen Tieren bis zum 25. Tag. In den Abbildungen ist jeweils die Prozentzahl der mit Ödemen reagierenden Tiere und der Histamingehalt der Haut in γ/g angegeben. Die Kurve für den Histamingehalt wurde aus den arithmetischen Mittelwerten der Einzelbestimmungen konstruiert.

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt das Ergebnis der Versuche mit Compound 48/80. Nach den ersten 3 Injektionen zeigten die Tiere eine erhebliche Cyanose, waren

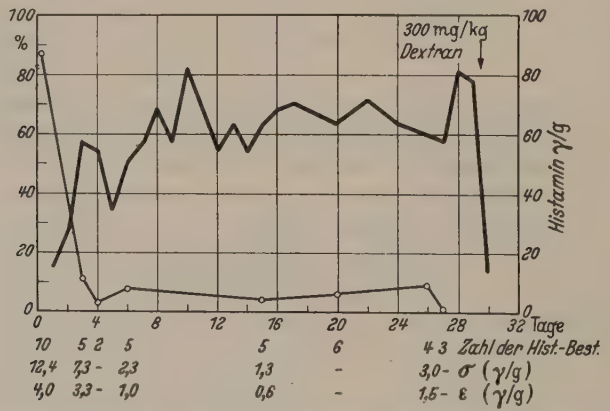


Abb. 1. Histaminverarmung der Rattenpfotenhaut und Häufigkeit von Ödemreaktionen nach Compound 48/80. Dick ausgezogene Linie = Zahl der mit Ödemen reagierenden Tiere in %. Dünn augezogene Linie = Histamingehalt der Pfotenhaut in γ/g

schlaff und dyspnoisch. Ödeme der Pfoten und Schnauzen bildeten sich nur bei einem Teil der Tiere aus und waren von geringer Intensität. In den folgenden Tagen verfärbten sich die Acren der Tiere nicht mehr violett sondern hellrot und es traten bei den meisten Tieren zum Teil sehr starke Ödeme auf. Bei der Gruppe, die eine Woche lang 2×4 mg/kg erhielt, waren die Ödeme besonders ausgeprägt. Die Kurve des Histamingehaltes entspricht genau der von Feldberg u. Talesnik. Nach 4 Tagen hatte der Histamingehalt um über 90% des normalen Wertes abgenommen. Die Ödeme entwickeln sich also erst dann, wenn die Haut bereits

weitgehend an Histamin verarmt ist, während die anfangs sehr erhebliche Histaminfreisetzung nur in wenigen Fällen vom Auftreten geringer Ödeme begleitet ist. Eine Resistenz gegen Compound 48/80 ließ sich nicht erzielen. Am 30. Tage wurde den restlichen Tieren 300 mg/kg Dextran intraperitoneal injiziert, von denen nur 2 mit Ödemen reagierten (siehe Kurve).

Die Ödemreaktionen nach Dextran (Abb. 2) sind nach den ersten Injektionen am stärksten und am häufigsten. Allmählich nimmt die Zahl der mit Ödemen reagierenden Tiere ab. Eine Resistenz aller oder fast aller Tiere läßt sich nach ungefähr 14–18 Tagen erzielen, wenn man täglich 2×300 mg/kg Dextran injiziert. Der Histamingehalt nimmt allmählicher ab als nach Compound 48/80 und betrug nach 18 Tagen ungefähr 20 γ/g.

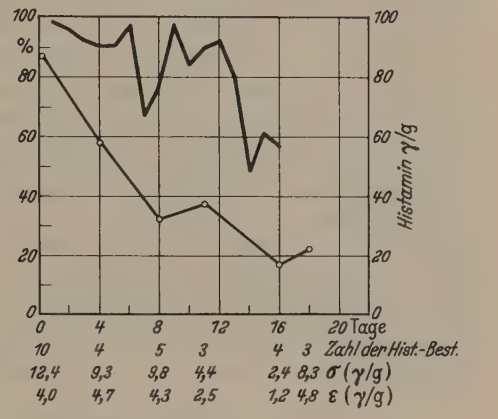


Abb. 2. Histaminverarmung der Rattenpfotenhaut und Häufigkeit von Ödemreaktionen nach Dextran. Dick ausgezogene Linie = Zahl der mit Ödemen reagierenden Tiere in %. Dünn ausgezogene Linie = Histamingehalt der Pfotenhaut in γ/g

Die Kurve der Ödemhäufigkeit bei chronischer Behandlung mit Eiklar (Abb. 3) weist erhebliche Schwankungen auf. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen mit etwas anderer Methodik schon Eichenberger, Schmidthauser und Rufener. In eigenen Versuchen waren am 16. Tag alle 12 Tiere refraktär, die restlichen 6 Tiere (in der Zeichnung nicht mehr eingetragen) blieben bis auf 1 Tier, das 1 mal reagierte, resistent. Der Histamingehalt der Haut nahm nur wenig (etwa 40%) ab und blieb nach dem 10. Tag konstant.

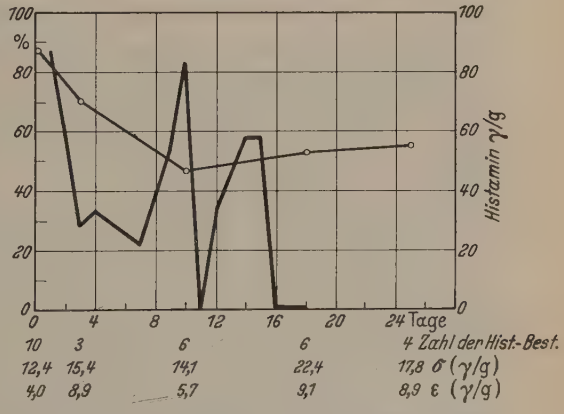


Abb. 3. Histaminverarmung der Rattenpfotenhaut und Häufigkeit von Ödemreaktionen nach Eiklar. Dick ausgezogene Linie = Zahl der mit Ödemen reagierenden Tiere in %. Dünn ausgezogene Linie = Histamingehalt der Pfotenhaut in γ/g

In einer weiteren Versuchsreihe wurden 20 Ratten in 6 Tagen mit insgesamt 12 mg/kg Compound 48/80 vorbehandelt. Danach wurde von

5 Tieren der Histamingehalt der Pfotenhaut bestimmt. Er betrug im Mittel 7,6 γ/g. Das sind 9% des normalen Histamingehaltes. 8 von den vorbehandelten Tieren wurden 300 mg/kg Dextran und den restlichen 7 Ratten 0,5 ml/100 g Eiklar injiziert. Alle Tiere bekamen starke Ödeme der Pfoten und Schnauzen.

Wenn Eiklar- und Dextranödeme auf verschiedene Weise entstünden, müßte es unter Umständen möglich sein, bei dextranresistenten Tieren mit Ovomucoid Ödeme auszulösen. Zu diesem Zweck wurden 12 Ratten mit einer Dextranfraktion eines einheitlichen Molekulargewichtes von 100000 chronisch behandelt. Die täglichen Dosen betrugen anfangs 1×300 mg/kg und nach 12 Tagen 2×300 mg/kg. Eine Resistenz fast aller Tiere trat nach 20 Tagen ein. Dann wurden 6 Tiere 2 Tage mit je 100 mg/kg Ovomucoid intraperitoneal behandelt. Keines der Tiere reagierte mit Ödemen. Den übrigen 6 Tieren wurden 2 mg/kg Compound 48/80 injiziert. Danach trat eine starke Cyanose und Schwäche der Tiere ein, jedoch keine Ödeme.

Diskussion

Die Tatsache, daß nach Compound 48/80 starke Ödeme erst auftreten, wenn die Pfotenhaut weitgehend an Histamin verarmt ist, läßt erhebliche Zweifel aufkommen, daß die Ödeme überhaupt durch das freigesetzte Histamin entstehen. In diesem Falle müßte die Ödemintensität gerade nach den ersten Injektionen am stärksten sein, wenn viel größere Histaminmengen freigesetzt werden. Beim Eiklarödem ist das Auftreten der Ödeme völlig unabhängig vom Histamingehalt der Haut. Beim gleichen Histamingehalt können alle Tiere oder keines reagieren. Auch dieser Befund ist mit der Annahme einer ursächlichen Bedeutung des Histamins für die Ödementstehung schwer in Einklang zu bringen. Lediglich beim Dextranödem gehen Histaminkurve und Ödemhäufigkeitskurve parallel. Allerdings wiesen auch hier reagierende und nicht reagierende Tiere den gleichen Hauthistamingehalt auf. Nach Vorbehandlung mit 12 mg/kg Compound 48/80 und Histaminverarmung der Pfotenhaut um fast 90% bekamen alle Tiere nach anschließenden Dextran- oder Eiklarinjektionen starke Ödeme. Dagegen sind Tiere, die längere Zeit vorbehandelt werden und nach Compound 48/80 mit Ödemen reagieren, gegen Dextran resistent (Abb. 1). Feldberg u. Talesnik haben ebenfalls nach längerer Vorbehandlung mit Compound 48/80 mit Eiklar keine Ödeme mehr erzeugen können. Sie schlossen daraus, daß kein Histamin mehr zur Verfügung stand, welches nach ihrer Meinung für die Ödementstehung verantwortlich ist, und daß deswegen die Tiere nicht reagierten. Diese Schlußfolgerung ist nach den vorliegenden Ergebnissen nicht ganz berechtigt, denn 1. hat der Histamingehalt der Haut schon nach geringen Dosen Compound 48/80 (etwa

10 mg in 4 Tagen) einen Minimalwert erreicht, der nach weiterer Behandlung nicht mehr unterschritten wird. (Abb. 1) und 2. reagieren die Tiere zum größten Teil nach wie vor nach Compound 48/80 mit Ödemen. Nach den sich aus den Versuchsergebnissen ergebenden Schlußfolgerungen kann das Histamin bei diesen anaphylaktoiden Reaktionen der Ratte keine wesentliche Rolle spielen.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Alberty bei seinen sehr sorgfältigen Untersuchungen über die anaphylaktische Reaktion des isolierten Meerschweinchendarms mit der Schulz-Daleschen Versuchsanordnung. Er konnte zeigen, daß anaphylaktische Darmkontraktionen durch Tripelenamin etwa 4mal weniger gehemmt wurden, als histaminbedingte Kontraktionen und weniger als 10% der freigesetzten H-Substanz sich histaminähnlich verhielt. Die H-Substanz bewirkte eine Kontraktion des isolierten Rattenuterus, der auf entsprechend darmwirksame Histamindosen nicht reagierte. Aus diesen Befunden ergibt sich, daß die bei der anaphylaktischen Reaktion freigesetzte „H-Substanz" nicht mit Histamin identisch sein kann. Neuerdings hat Vogt bei der Durchströmung des Darmes anaphylaktischer Meerschweinchen nach Injektionen von Antigen die Freisetzung eines darmwirksamen Polypeptids beschrieben, das er aus der Durchströmungsflüssigkeit isolieren konnte. Die Substanz verhält sich bezüglich ihrer Löslichkeit und gegen Desaminierung wie Bradykinin.

Möglicherweise wird auch bei den anaphylaktoiden Reaktionen der Ratte eine solche „H-Substanz" freigesetzt.

Zusammenfassung

Untersucht wurde die Histaminfreisetzung in der Rattenpfotenhaut bei chronischer Behandlung mit Compound 48/80, Dextran und Eiklar. Ferner wurde gleichzeitig die Zahl der mit Ödemen reagierenden Tiere registriert.

Nach Compund 48/80 tritt die Ödemreaktion nach etwa 15 min ein und ist nach 2—3 Std abgeklungen; Eiklar- und Dextranödeme entwickeln sich nach 1—1½ Std und klingen nach etwa 6 Std ab. Während die letztgenannten Ödeme bei der ersten Injektion am häufigsten auftraten, entwickelt sich das Ödem nach Compound 48/80 erst nach der 3., 4. oder 5. Injektion, wenn die Haut bereits weitgehend an Histamin verarmt ist. Der Histamingehalt der Pfotenhaut war am 4. Tag bereits um 97% vermindert und nahm danach nicht weiter ab.

Bei den Versuchen mit Eiklar nahm die Ödemhäufigkeit in den ersten Tagen rasch ab und wies dann große Schwankungen auf. Am 16. Tage waren die Tiere resistent. Der Histamingehalt der Haut hatte am 10. Tag um 40% abgenommen und blieb danach gleich.

Einen ähnlichen Verlauf nahmen die Versuche mit Dextran, nur daß keine Resistenz der Tiere eintrat und die Haut stärker (bis $^1/_5$ des Normalwertes) an Histamin verarmt wurde. Ratten, deren Hauthistamingehalt der Pfoten durch Vorbehandlung mit Compound 48/80 bis auf 9% des

Normalwertes vermindert war, reagierten auf nachfolgende Dextran- oder Eiklarinjektionenn mit starken Ödemen.

Die mitgeteilten Befunde sprechen gegen eine alleinige ursächliche Bedeutung des Histamins für die Ödementstehung.

Für die freundliche Überlassung von Macrodex und einheitlichen Dextranfraktionen danke ich der wissenschaftlichen Abteilung der Knoll A.-G.

Compound 48/80 wurde mir von Herrn Dr. E. de Beer, The Wellcome Research Laboratories, Tuckahoe 7, New York, liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt.

Nachtrag bei der Korrektur. Nach erfolgter Drucklegung wurde auf eine Anregung von W. Feldberg hin eine Serie von 20 Ratten mit Compound 48/80 in gleicher Weise chronisch behandelt und darauf geachtet, ob Unterschiede in der Zeit des Auftretens der Ödeme sowie ihrer Intensität und Dauer in den ersten 4 Tagen während der Histaminfreisetzung und in der späteren Periode bestehen. Dabei zeigte sich, daß in den ersten Behandlungstagen das Maximum der bei den meisten Tieren entstehenden geringfügigen Ödeme nach etwa 2 Std eintrat. Nach 5—6 Std waren sie abgeklungen. Pfoten und Schnauzen der Tiere waren dabei stark zyanotisch verfärbt. Nach erfolgter Histaminverarmung der Haut wurden 2mal täglich 4 mg/kg appliziert. Jetzt traten bei fast allen Tieren starke Ödeme der Schnauzen und Pfoten von hellroter Färbung auf mit einem Maximum nach 20—30 min und einer Dauer von 2—3 Std.

Als Erklärung der gefundenen Unterschiede kann man annehmen, daß die anfangs entstehenden schwachen Ödeme durch das freigesetzte Histamin hervorgerufen werden, während die später auftretenden Ödeme eine andere Ursache haben müssen.

Literatur

Alam, M., G. V. Anrep, M. Taloat and E. Wieninger: J. of Physiol. **95**, 148 (1939). — Alberty, J.: Arch. internat. Pharmacodynamie **96**, 1, 14 (1953). — Alberty, J., et M. Schiede: Arch. internat. Pharmacodynamie **96**, 28 (1953). — Briot, M., et B. N. Halpern: C.r. Soc. Biol. (Paris) **146**, 21 (1952). — Feldberg, W.: J. of Pharmacy a. Pharmacol. **6**, 281 (1954). — Feldberg, W., and A. A. Miles: J. of Physiol. **120**, 205 (1953). — Feldberg, W., and J. Talesnik: J. of Physiol. **120**, 550 (1953). — Hahn, F., u. A. Wellmann: Klin. Wschr. **1952**, 998. — Hahn, F., A. Lange u. H. Giertz: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 603 (1954). — Halpern, B. N., et M. Briot: C.r. Soc. Biol. (Paris) **143**, 822 (1949); **146**, 1552 (1952). — Arch. internat. Pharmacodynamie **82**, 247 (1950); **91**, 291 (1952). — Halpern, B. N., M. Briot et Th. Neveu: C.r. Soc. Biol. (Paris) **148**, 308 (1954). — Kramer, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. (im Druck); **225**, 82 (1955). — Leger, J., and G. Masson: Amer. J. Med. Sci. **214**, 305 (1947). — Ann. Allergy **6**, 131 (1948). — Mac Intosh, F. C., and W. D. M. Paton: J. of Physiol. **109**, 190 (1949). — Mayeda, H.: Jap. J. Pharmacol. **3**, 62, 73 (1953). — Meier, R., F. Gross u. P. Desaulles: Klin. Wschr. **1951**, 653. — Morrison, J. L., A. P. Richardson and W. C. Bloom: Arch. internat. Pharmacodynamie **88**, 98 (1951). — Parker, J. T., and F. Parker: J. metabol. Res. **44**, 263 (1924). — Paton, W. D. M.: Brit. J. Pharmacol. **6**, 499 (1951). — Rocha e Silva, M.: Quart. Review of Allergy and. appl. Immun. **8**, 220 (1954). — Schachter, M., and J. Talesnik: J. of Physiol. **118**, 258 (1952). — Selye, H.: Endocrinology (Springfield, Ill.) **21**, 169 (1937). — Vogt, W.: Verh. 22. Tagung dtsch. Pharmakol. Ges. Graz 1955. — Woorhees, A.B., H. J. Baker and E. J. Pulaski: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **76**, 254 (1951).

Dr. Martin Kramer, Pharmakologisches Institut der Freien Universität Berlin

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 347—360 (1956)

Aus der Medizinischen Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. R. Duesberg)

Der Einfluß von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Aminocapronsäure, T-Vitamin Goetsch und WGH-SOLCO auf das Knochenmarkswachstum in vitro*

Von
R. Duesberg und L. Friederici

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. Dezember 1955)

Im Rahmen einer größeren Versuchsreihe über die therapeutische Beeinflussung der Agranulocytose und Panmyelopathie interessierte das Verhalten der undifferenzierten Reticulumzellen in der Gewebekultur. Das myeloische Parenchym unterliegt bekanntlich beim Züchten in vitro ebenso wie andere Körpergewebe einer Entdifferenzierung, so daß die Kulturen später nur noch aus spindeligen Elementen bestehen, die allgemein für Fibroblasten gehalten werden[1, 5]. In einer früheren Arbeit[7] konnte der Nachweis erbracht werden, daß in den Knochenmarkskulturen ein Teil dieser Zellelemente Phagocytoseeigenschaften besitzt und hiermit ihre reticulohistiocytäre Herkunft wahrscheinlich macht. Die Mehrzahl der Hämatologen hält die undifferenzierten Zellen des Markorgans zur Entwicklung in Stammformen der roten und weißen Reihe für befähigt. Man spricht diesen lymphoiden reticulären Zellen also pluripotente hämatopoetische Eigenschaften zu; ihren Übergang in erythrocytäre Vorstufen hat Fresen[6] für die chronische Erythroblastose histologisch demonstriert.

Im Zusammenhang mit der fibrösen Entartung des myelopoetischen Gewebes sollte die Frage behandelt werden, ob unter der Einwirkung bestimmter Substanzen die in den Zellen des Reticulums vermuteten hämatopoetischen Potenzen geweckt werden könnten, so daß sie zur Differenzierung veranlaßt würden oder aber sich wenigstens die stets zu beobachtende Entdifferenzierung der Knochenmarkskulturen hemmen ließe. Es wurde daher die Wirkung einiger Substanzen, deren Wachstumsförderung auf andere Zellarten bekannt war, in der Knochenmarkskultur geprüft. Die als Pflanzenwuchsstoffe bekannten Verbindungen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) und Aminocapronsäure sowie der Wirkstoffkomplex T-Vitamin Goetsch[9] und ein Wundgranulationsextrakt

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

(WGH SOLCO) kamen dabei zur Anwendung. Die beiden Pflanzenwuchsstoffe waren bisher an tierischem Material in vitro noch nicht untersucht worden. Für das T-Vitamin liegen dagegen Erfahrungen über die Wirkung auf Hefezellen und Bakterien[8, 13, 18] sowie auf Milzkulturen[12] vor. Der Wundgranulationsextrakt WGH SOLCO wurde von Lettré an Fibroblastenkulturen geprüft.

Methodik

Die Untersuchungen wurden am Oberschenkelmark der Ratte und des Meerschweinchens, sowie vereinzelt auch am Patientenknochenmark durchgeführt, das in Deckglaskulturen[3, 4] in der üblichen Weise gezüchtet wurde. Im Durchschnitt konnten von dem Knochenmark einer Ratte, das steril beiden Oberschenkelknochen entnommen wurde, 50—60 Kulturen angesetzt werden. Jeder Versuchssatz, der mit der gleichen Mischung des Nährmediums in einem Arbeitsgang hergestellt wurde, bestand aus 7 Einzelkulturen. Im allgemeinen wurden vom Knochenmark eines Tieres 1—2 Kontrollsätze und 5—6 Versuchssätze mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz angefertigt, so daß die Kontrollkulturen eines Versuches jeweils mit der gleichen Zahl der Wuchsstoffkulturen einer bestimmten Konzentration verglichen werden konnten. Als Medium diente ein Gemisch, das zu gleichen Teilen aus Huhnplasma, Hühnerembryonalextrakt, homologem Serum und einer physiologischen Salzlösung nach Pannet-Compton (PC) besteht. Den Versuchskulturen wurden an Stelle der Salzlösung die Wuchsstoffe, die in einer den Kontrollversuchen adäquaten Menge PC gelöst waren, in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Für die Kulturen mit Rattenknochenmark wurde Humanserum benutzt, das, wie frühere Untersuchungen[7] zeigen konnten, ebensogut wie das artspezifische Serum von den Rattenknochenmarkszellen vertragen wird. Das Umsetzen der Kulturen in ein frisches Medium erfolgte beim Rattenknochenmark meist am 5. Tag, bei den Meerschweinchenkulturen bereits am 3. Tag. Zur cytologischen Untersuchung wurden das explantierte Mutterstück und die Zellen der Wachstumszone nach 6, 12, 24, 48, 72 und 96 Std, zum Teil auch noch nach 8—10 Tagen auf Objektträgern vorsichtig ausgestrichen und nach Pappenheim gefärbt. Außerdem wurden regelmäßig Totalpräparate nach 3—5 Tagen und bei den gut wachsenden Versuchssätzen noch nach mehreren Wochen angefertigt. Die Färbung der Gesamtkultur erfolgte ebenfalls mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung, wobei sich das Kulturmedium blauviolett anfärbte. Beim Differenzieren in Aceton-Xylol ließ sich aber in den meisten Fällen eine weitgehende Entfärbung des Mediums erzielen, so daß mit dieser Technik dauerhafte Totalpräparate hergestellt werden konnten. Außer der fortlaufenden mikroskopischen Beobachtung der lebenden Kulturen wurde eine Differenzierung der Ausstrichpräparate vorgenommen, um qualitative Veränderungen des gezüchteten Knochenmarkes zu erfassen. Die Wachstumsgröße der einzelnen Kulturen wurde durch Planimetrieren der bei Lupenvergrößerung projizierten Mutterstücke und Wachstumszonen bestimmt und die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen im Vergleich zu den Kontrollen nach der Varianzanalyse von Snedecor[15] statistisch gesichert.

Ergebnisse

Die Untersuchungen mit 2,4-D wurden an 511 Ratten- und 112 Meerschweinchenknochenmarkskulturen durchgeführt, die jeweils so oft umgesetzt wurden, bis ihre Wachstumstendenz erlosch. Es fand sich eine deutliche Förderung des Zellwachstums, die mit fallender Konzentration

Tabelle 1

Kontrolle	2,4-D				
	1 : 400	1 : 4000	1 : 40000	1 : 400000	1 : 4000000
$\frac{W}{M}$ 3,67	2,19 $P < 0{,}05$	5,19 $P < 0{,}01$	4,94 $P = 0{,}05$	5,32 $P < 0{,}05$	5,64 $P < 0{,}01$

zunahm, während höhere Konzentrationen hemmten. Tab. 1 gibt die Quotienten der Mittelwerte von Wachstumszonen (W) und Mutterstücken (M) der einzelnen Versuchsreihen wieder. Bereits bei einer

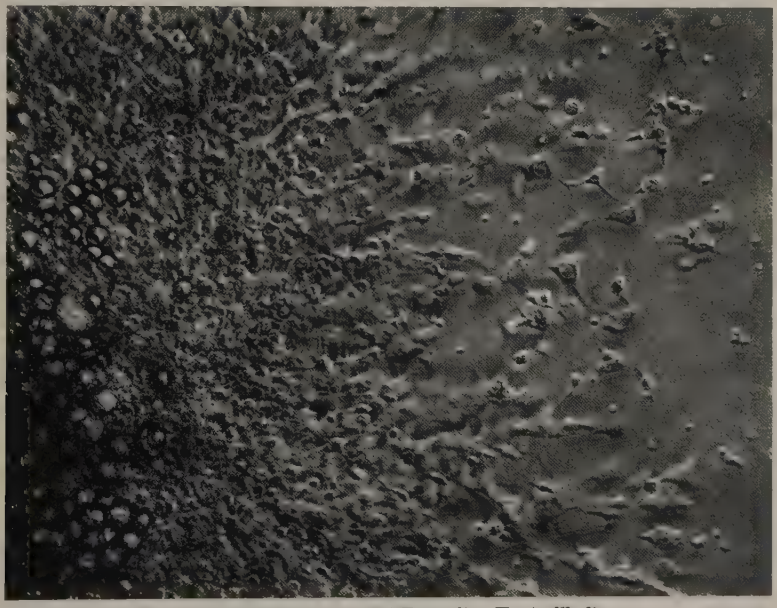


Abb. 1. Ausschnitt einer 14 Tage alten Kontrollkultur

Konzentration von 1:4000 war eine Verbreiterung der Wachstumsareale erkennbar, die sich bei einer Verdünnung von 1:4000000 noch deutlicher abzeichnete. Wenn man von der Versuchsserie 1:40000 absieht, verläuft das Wachstum geradezu umgekehrt proportional der Konzentration. Eine Verzögerung der Entdifferenzierung trat nicht ein, eher wurde das Gegenteil beobachtet. Es fanden sich in den ersten Tagen massenhaft unreife, nicht näher zu differenzierende Rundzellen, die später von einem dichten und breiten Saum spindeliger und sternförmiger Zellen verdrängt wurden. Die Zellen der Wachstumszone sind bei den Versuchskulturen im Gegensatz zu den schmalen Spindelzellen der Kontrollen meist etwas breiter und plumper. Abb. 1 zeigt eine 14 Tage alte Kontrollkultur mit Mutterstück und aufgelockerter Wachstumszone.

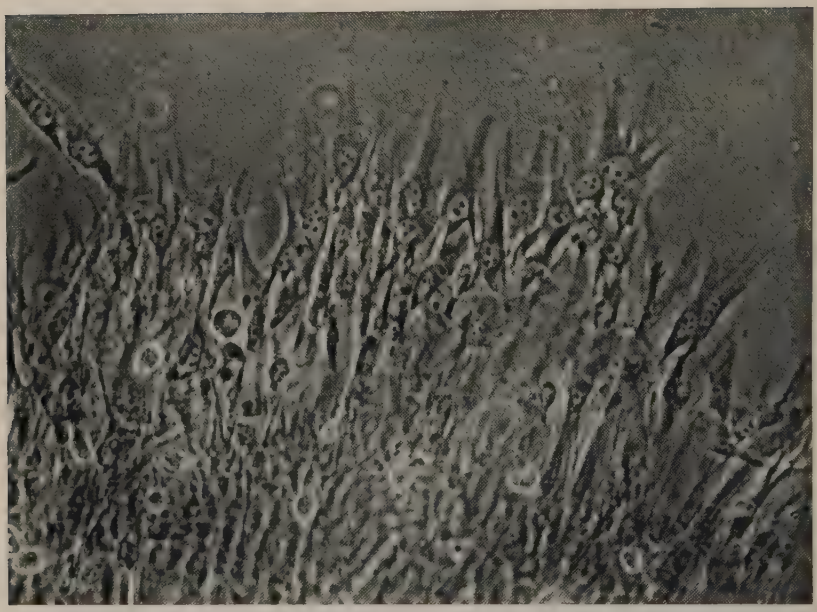


Abb. 2. Wachstumszone einer 14 Tage alten Kultur mit Zusatz von 2,4-D (1 : 40000). Phasenkontrast

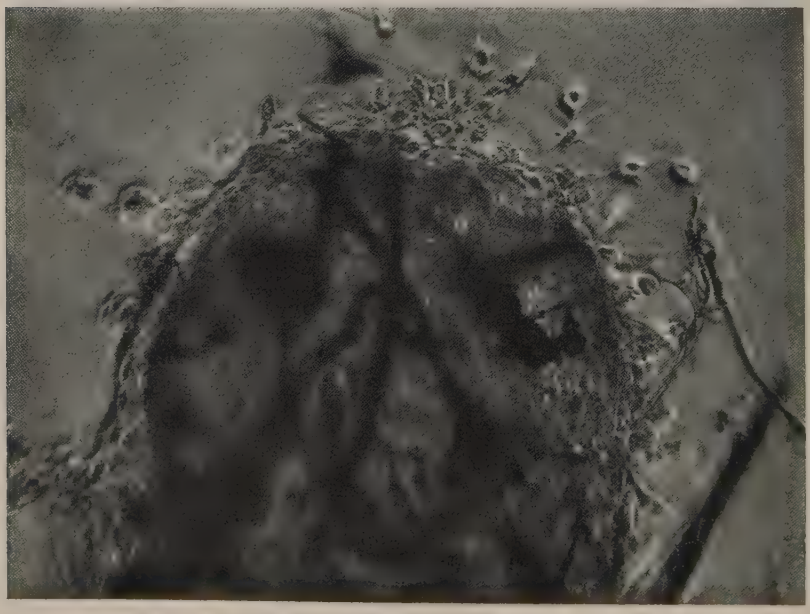


Abb. 3. Kontrollkultur nach 40 Tagen

Im Gegensatz dazu läßt Abb. 2 den breiteren und dichteren Wachstumssaum einer gleichaltrigen Versuchskultur (2,4-D 1 : 40000) erkennen. Nach 40 Tagen sind die meisten Kontrollkulturen abgestorben (Abb. 3), während bei Zusatz von 2,4-D (1:4000000) noch ein deutliches und intensives Wachstum vorhanden ist (Abb. 4). Es gelang mit Hilfe dieses Wuchsstoffes Knochenmarkskulturen bis zu 60 Tagen über 10—12

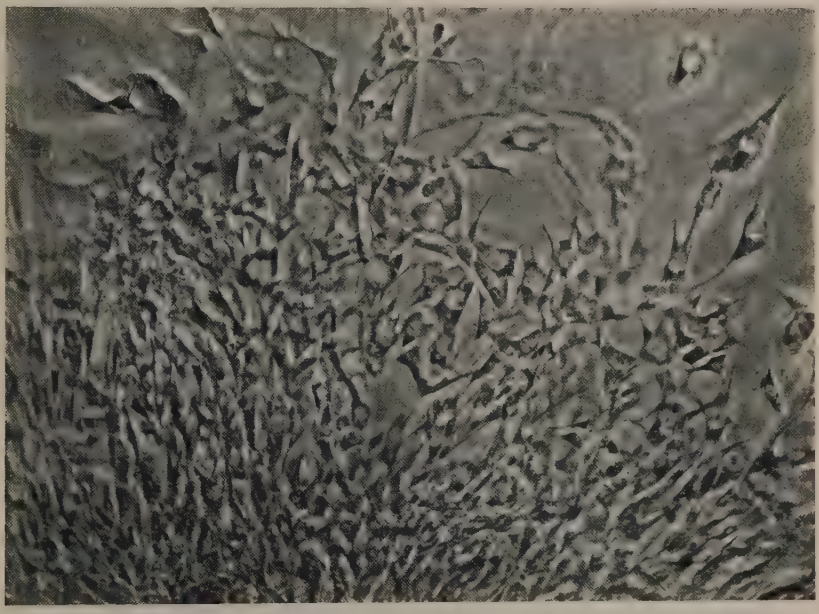


Abb. 4. Wachstumszone einer 40 Tage alten Kultur mit Zusatz von 2,4-D (1 : 4000000)

Passagen lebend zu erhalten; demgegenüber wuchs die Mehrzahl der Kontrollkulturen nach der 3. bis 4. Passage nur noch sehr spärlich weiter oder starb ganz ab.

Eine ähnliche proliferationsfördernde Wirkung ließ sich mit Aminocapronsäure erzielen. Diese Versuchsserie, die an 350 Kulturen von Rattenknochenmark durchgeführt wurde, ergab keine wesentlichen morphologischen Abweichungen von den bei 2,4-D-Zusatz beschriebenen Befunden. Es fanden sich lediglich etwas mehr Makrophagen in der Kultur. Tab. 2 enthält die Mittelwerte der einzelnen Versuchsserien, die

Tabelle 2

Kontrolle	Aminocapronsäure				
	1 : 400	1 : 4000	1 : 40000	1 : 400000	1 : 4000000
M 4,68	4,53	4,39	4,79	4,84	4,18
	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}01$	$P < 0{,}01$	$P > 0{,}05$

erkennen lassen, daß nur bei Konzentrationen von 1:40000 und 1:400000 eine signifikante Wachstumssteigerung vorhanden ist. Höhere Konzentrationen hemmen wiederum die Vitalität der Kulturen. Bei Zusatz von Aminocapronsäure 1:4000000 ist die Streuung innerhalb der Versuchsreihe so stark, daß ein Quotient der Mittelwerte $W : M$ von nur 4,18 resultiert, der aber nicht statistisch gesichert von der Kontrolle abweicht. Andererseits läßt diese Konzentration ebenso wie 1 : 40000 und

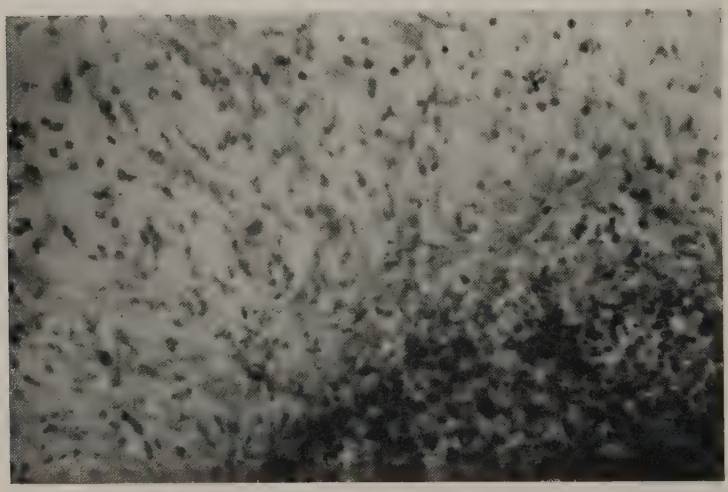


Abb. 5. 5 Tage alte Kultur mit T-Vitamin 1 : 4000

1 : 400000 einen günstigen Einfluß auf die Lebensdauer der Kulturen erkennen.

Der Wirkstoffkomplex T-Vitamin Goetsch, der an 630 Kulturen (Rattenknochenmark) geprüft wurde, übt neben einer proliferationsfördernden Wirkung sicher noch einen günstigen Einfluß auf die Reifung und Differenzierung aus. Wie Tab. 3 zeigt, sind die Mittelwerte der

Tabelle 3

Kontrolle	T-Vitamin Goetsch					
	1 : 40	1 : 400	1 : 4000	1 : 40000	1 : 400000	1 : 4000000
$\frac{W}{M}$ 4,74	2,28 $P < 0{,}01$	4,01 $P > 0{,}05$	4,40 $P > 0{,}05$	4,10 $P > 0{,}05$	4,29 $P > 0{,}05$	4,16 $P > 0{,}05$

einzelnen Versuchsreihen nicht signifikant von den Kontrollen unterschieden. Dieses Ergebnis wird lediglich dadurch vorgetäuscht, daß bei der Bestimmung der Wachstumszonen nur die dichten Zellsäume um die Mutterstücke gemessen wurden, nicht aber die wesentlich größeren Areale peripher davon, in die die amöboidbeweglichen Rundzellen in

großer Zahl ausgewandert waren. Nach 22 Tagen fanden sich in den Versuchskulturen, vor allem bei einer Konzentration von 1 : 400000, neben Makrophagen noch große mononucleäre Zellen, die auf Grund ihrer färberischen Eigenschaften als große lymphoide Reticulumzellen angesprochen wurden. Selbst in der 5. Woche waren zwischen den plumperen, mehr epitheloiden reticulären Zellen der Wachstumszone einzelne Rundzellen vom Charakter der eosinophilen Myelocyten und kleinere nekrotische Rundzellen von Leukocytengröße vorhanden.

Abb. 5 u. 6 zeigen Ausschnitte 5 Tage alter Kulturen bei verschiedenen Konzentrationen von T-Vitamin Goetsch. In dem in Abb. 5

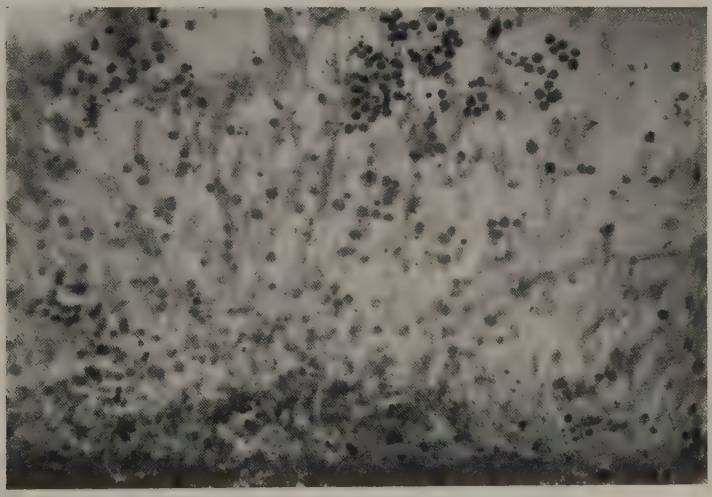


Abb. 6. 5 Tage alte Kultur mit T-Vitamin 1 : 400000

(T-Vitamin 1 : 4000) gewählten Ausschnitt überwiegen etwas die Spindelzellen. Abb. 6 hingegen läßt eine deutliche Vermehrung der Rundzellen erkennen, die sich im gefärbten Präparat und im Ausstrich gut differenzieren lassen. Vor allem sind die Stammzellen, lymphoide Reticulumzellen und Eosinophile noch sehr gut erhalten, neutrophile Granulocyten zeigen dagegen deutliche Degenerationserscheinungen.

Bei einer Konzentration von 1 : 4000000 sind die Rundzellen nach 5 Tagen infolge Degeneration schon weitgehend aus der Kultur verschwunden, so daß der Wachstumssaum um das Mutterstück fast nur aus sternförmigen und plumpen spindeligen Zellen besteht. Die besten Ergebnisse mit dem Wirkstoffkomplex T-Vitamin Goetsch in bezug auf Lebensdauer der Kulturen und Reifung der Rundzellen, die übrigens reichlich Mitosen aufwiesen, wurden bei Konzentrationen von 1 : 40000 und 1 : 400000 erzielt. Höhere Konzentrationen hemmten das Wachstum

eindeutig, während bei stärkeren Verdünnungen kein gesicherter Unterschied gegenüber den Kontrollkulturen bestand.

Der Wundgranulationsextrakt WGH SOLCO wurde an 428 Ratten- und 322 Meerschweinchenknochenmarkskulturen getestet. Wie vermutet,

Abb. 7. Wachstumszone einer 2 Tage alten Meerschweinchenknochenmarkskultur mit WGH-Solco 1:4

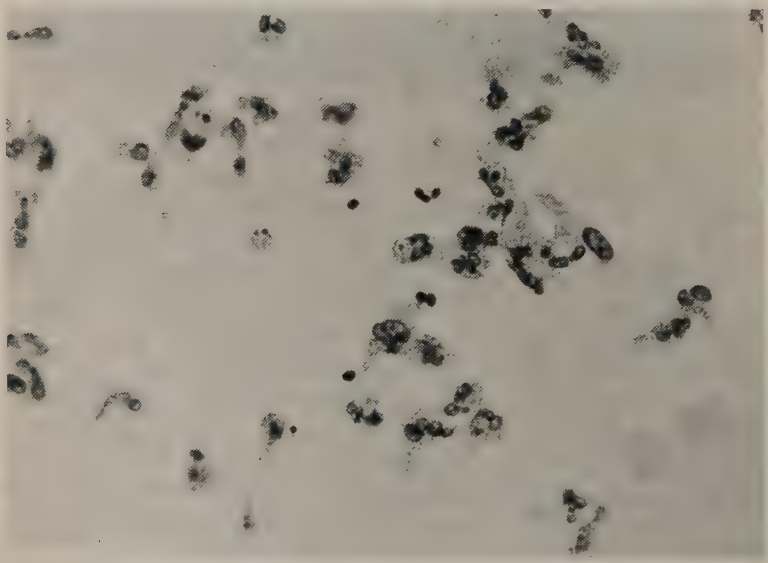


Abb. 8. Ausschnitt aus Abb. 7 bei stärkerer Vergrößerung: Eosinophile und neutrophile Granulocyten in der Wachstumszone

fand sich tatsächlich eine deutliche Zunahme der Granulozyten, vorwiegend der eosinophilen Stab- und Segmentkernigen, die so zahlreich auftraten, daß die wenigen vom Mutterstück auswachsenden Spindelzellen fast völlig verdeckt wurden. Selbst nach 5 Tagen waren neben den eosinophilen noch neutrophile Segmentkernige vorhanden, während die Kontrollkulturen zum gleichen Zeitpunkt überwiegend Spindelzellen und eine wesentlich geringere Anzahl von Granulocyten in der Auswanderungszone erkennen ließen. Abb. 7 zeigt das Mutterstück und die

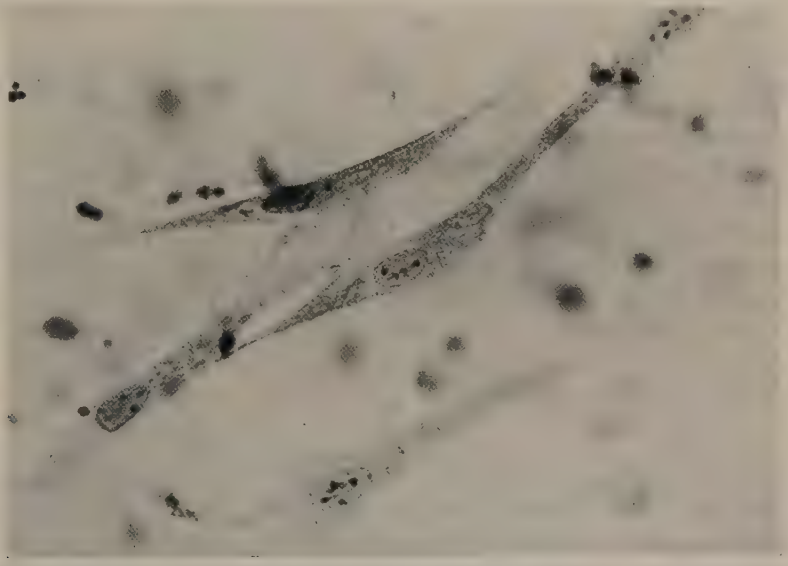


Abb. 9. Spindelzellen und degenerierte Rundzellen aus der Wachstumszone einer Kontrollkultur (Meerschweinchenknochenmark)

breite, aus Rundzellen bestehende Auswanderungszone einer Versuchskultur, die wesentlich größer als bei den Kontrollen war. In einem Ausschnitt bei stärkerer Vergrößerung sieht man deutlich die eosinophilen und neutrophilen Granulocyten (Abb. 8). Demgegenüber finden sich in der Auswanderungszone der Kontrollkulturen mehr spindelige Zellen (Abb. 9).

Bemerkenswert ist, daß der Zusatz von WGH in Originalkonzentration (Endkonzentration im Medium 1 : 4) diese Veränderungen auslöst und nicht wie die übrigen geprüften Substanzen in solch hoher Konzentration das Wachstum hemmt. Verdünnungen von 1 : 40 sind ebenfalls im gleichen Sinne, jedoch schwächer wirksam, während geringere Konzentrationen (1 : 400, 1 : 4000) das Wachstum der Kulturen nicht mehr fördern. Diese Befunde lassen sich jedoch nur mit frischem Wundgranulationsextrakt erzielen, da offenbar die wirksamen Faktoren im

WGH einer Alterung unterliegen, die sich trotz Aufbewahrung im Kühlschrank nach 3—4monatiger Lagerung in Form einer Wachstumshemmung bemerkbar macht. Noch schneller vollzieht sich dieser Prozeß bei Luftzutritt, so daß bereits 8 Tage in verschlossenem Zentrifugenröhrchen aufbewahrter Wundgranulationsextrakt in seiner Wirkung deutlich vom luftdicht verschlossenen WGH gleicher Charge abweicht. Tab. 4 gibt die Mittelwerte der Wachstumsareale der Meerschweinchenkulturen mit verschieden altem WGH wieder. Tab. 5 zeigt dasselbe für die Rattenknochenmarkskulturen.

Tabelle 4. *Meerschweinchenknochenmark*

Kontrolle	WGH-Solco				Alter des WGH
	1 : 4	1 : 40	1 : 400	1 : 4000	
10,37	15,07	11,86	9,03	8,99	1 Monat
13,63	10,25	13,83	13,34	13,54	2 Monate

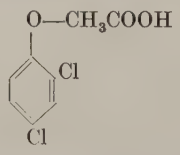
Tabelle 5. *Wachstumszonen der Rattenknochenmarkskulturen*

Kontrolle	WGH-Solco	Alter des WGH
6,37	8,75	10 Tage
6,55	5,44	2 Monate
6,21	4,72	4 Monate
6,30	3,85	5 Monate
6,15	3,88	5 Monate

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse mit WGH war es von Interesse, zu klären, ob der Wundgranulationsextrakt als Ersatz für den Hühnerembryonalextrakt verwendet werden kann. Alle Versuche, die in dieser Richtung unternommen wurden, schlugen jedoch fehl. Kein einziges Mal gelang es, ohne Zusatz von Embryonalextrakt mit WGH allein ein annähernd gleiches Wachstum wie bei den mit Embryonalextrakt angesetzten Kontrollkulturen zu erzielen.

Diskussion

Die Wirkung des Pflanzenwuchsstoffs 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure,



die in der Botanik seit längerem als Herbicid bekannt ist[10, 17, 20, 21], wurde auf das Wachstum tierischen Knochenmarkes in vitro geprüft. In schwächeren Konzentrationen fördert, bei höheren Konzentrationen hemmt sie das Wachstum zahlreicher Pflanzen. Bei Gewebekulturen von

Pflanzen kann sie das Heteroauxin ersetzen; sie ist 10mal stärker wirksam als dieses und führt zu einer deutlichen Steigerung der Zellatmung[16].

Die Vorstellung, daß die biochemischen Grundprozesse in undifferenzierten Reticulumzellen möglicherweise Ähnlichkeiten zu denen primitiver Pflanzenzellen aufweisen, veranlaßte uns zu der Anwendung der Pflanzenwuchsstoffe, zumal bei grober Betrachtung das biologische Verhalten von Blutzellen gegenüber primitiven Organismen, z. B. Bakterien, gewisse Analogien aufweist, indem beide Zellarten unter dem Einfluß wachstumsfördernder und -hemmender Substanzen eine ähnliche Empfindlichkeit zu erkennen geben. Es wurde also unterstellt, daß durch Zusatz von 2,4-D fermentative Vorgänge in den Reticulumzellen ebenso wie bei den Pflanzen katalysiert werden könnten. Es zeigte sich, daß tatsächlich eine deutliche Steigerung des Wachstums eintrat, am stärksten bei Konzentrationen von 1:400000 und 1:4000000. Eine Verzögerung oder Verhinderung der Entdifferenzierung ließ sich nicht erreichen. Es war vielmehr mit zunehmender Proliferation eine verminderte Reifungstendenz verbunden. Auf welchem Wege der Wuchsstoff in das Zellwachstum eingreift, ist nicht bekannt. Man darf wohl annehmen, daß in vitro durch die Beeinflussung fermentchemischer Prozesse die Eiweißsynthese in der Zelle bei gleichzeitiger Aktivierung der Mitosetätigkeit gesteigert wird.

Die Befunde nach Anwendung des weniger bekannten Pflanzenwuchsstoffes Aminocapronsäure stimmen annähernd mit den oben beschriebenen Ergebnissen überein. Das Wirkungsoptimum liegt allerdings bei einer Verdünunng von 1:400000, also bei einer im Vergleich zu 2,4-D 10mal höheren Konzentration.

Nach Abschluß der Untersuchungen stießen wir auf eine Mitteilung von Ramseyer und du Pan[14], die 1937 über die Wirkung von Auxinen auf Hühnerfibroblasten berichteten. Mit einem auxinhaltigen Pollenextrakt von Orchideen konnten sie das Wachstum der Fibroblasten beschleunigen, so daß eine solche Kultur bereits nach 4—5 Std das Aussehen einer 10 Std alten Kontrollkultur erlangt hatte. Wenn auch diese Auxine nicht näher analysiert worden sind, kann doch die Tatsache, daß das Wachstum tierischer Zellen durch Pflanzenwuchsstoffe positiv beeinflußt wird, als Bestätigung der Vermutung angesehen werden, daß die vitalen Prozesse der undifferenzierten Zellen des Pflanzen- und des Tierreiches gewisse Ähnlichkeiten aufweisen.

Anders verhält es sich mit dem Wirkstoffkomplex, den Goetsch[9] als T-Vitamin bezeichnet hat, weil er bei Termiten Riesenwuchs hervorrief. Der Wirkstoff wurde von Wacker und Mitarbeitern[19] mikrobiologisch und papierchromatographisch analysiert, so daß seine Zusammensetzung heute weitgehend bekannt ist. Um ein echtes Vitamin handelt es sich sicher nicht.

Der Extrakt enthält außer den wichtigsten Aminosäuren Vitamin B 1, B 2, B 6 und B 12, Folsäure, Folinic acid, Lactobacillus bulgaricus-Faktor und Desoxyriboside. Diese Substanzen, deren Einfluß auf den Kernstoffwechsel bekannt ist,

dürften vorwiegend für das unterschiedliche Verhalten der Kulturen nach Zusatz von Pflanzenwuchsstoffen und T-Vitamin verantwortlich sein.

Bei entsprechender Verdünnung (1:40000—1:400000) scheint für das Zellwachstum in vitro ein optimales Milieu geschaffen zu sein, so daß bis zu einem gewissen Grade noch nach mehreren Passagen unreife Granulocyten vorhanden waren, ein Befund, der bei den Kontrollen zum gleichen Zeitpunkt nicht erhoben werden konnte. Im Gegensatz zu Knoth[12], der an Meerschweinchen-Milzkulturen bei Konzentrationen von 1:20—1:50 eine völlige Hemmung, bei 1:100—1:100000 nach verzögertem Anfangswachstum eine nachfolgende Wachstumsbeschleunigung spindeliger Elemente sah, konnten wir in Knochenmarkskulturen keine sichere Steigerung des Spindelzellwachstums feststellen. Dafür fanden sich peripher von den dichten Spindelzellsäumen massenhaft große und kleine Rundzellen, die zusammen ein wesentlich größeres Areal einnahmen, als die Wachstumszonen der Kontrolle. Da jedoch bei Projizierung der Kulturen nur die wirklichen Wachstumsbezirke erfaßt wurden und nicht die Auswanderungszonen mit den amöboidbeweglichen Zellen, ließ sich statistisch die proliferationsfördernde Wirkung des Wuchsstoffes nicht erfassen. Sie ist sicher vorhanden und zeigt sich besonders bei der Dauerzüchtung, die bei Zusatz von T-Vitamin (1:40000—1:400000) wesentlich besser gelang als bei den Normalkulturen ohne Wuchsstoff.

Es ist vorerst noch unbekannt, ob das T-Vitamin in die zelluläre Eiweißsynthese eingreift. Nach Untersuchungen von Gram u. Schlipköter[8], die bei Prüfung der Wirkung dieses Gemisches auf Leptospirenkulturen keine Alterserscheinungen wie in Normalkulturen sahen, scheint die wachstumsfördernde Wirkung von T-Vitamin auf dem Gehalt an B-Komplex zu beruhen. Bei Prüfung der 14 im T-Vitamin nachgewiesenen Aminosäuren und ihrer Kombinationen an Leptospiren zeigte sich keine Wachstumsförderung. Ebensowenig waren Vitamin B 2 und B 6 wirksam. Gute Erfolge ließen sich dagegen mit Vitamin B 1 (3 γ/cm^3) und Cocarboxylase (7 γ/cm^3) erzielen. Wurde diesem Gemisch außerdem noch Nicotinsäure und Nicotinsäureamid zugesetzt, so steigerte sich der wachstumsfördernde Effekt bis auf 364,9%. Es sei allerdings bemerkt, daß der Nachweis der Cocarboxylase im T-Vitamin noch nicht erbracht ist. Unabhängig davon zeigen aber die Versuchsergebnisse, daß für Leptospiren die Kombination von Vitamin B 1 und dem Phosphorsäureester des Vitamins B 2 wirksamer ist als der Wirkstoffkomplex T-Vitamin Goetsch, der möglicherweise die für das Gedeihen der Leptospiren notwendigen Stoffe nicht in der richtigen Konzentration enthält.

Auch bei Bakterien beschleunigt der Wirkstoffkomplex eindeutig das Wachstum. Lohding[13] konnte bei Zusatz von T-Vitamin selbst die anspruchsvollen Gonokokken auf gewöhnlichem Agar züchten, ein Beweis dafür, daß das T-Vitamin nicht nur in den Stoffwechsel der tierischen, sondern auch in den der primitiven Pflanzenzelle fördernd eingreift. Diese Tatsache spricht ebenfalls für die Annahme, daß sich die fermentativen Stoffwechselregulationen in den undifferenzierten Zellen aller Organismen ähnlich verhalten.

Von besonderer Bedeutung war die Prüfung des Wundgranulationsextraktes, da in ihm für die Zellproliferation wichtige und notwendige

Stoffe enthalten sein dürften. Daß in vitro nicht das Spindelzellwachstum, sondern sogar die Proliferation der Rundzellen gefördert wurde, war jedoch nicht vorauszusehen. Welche Stoffe hier im einzelnen wirksam sind, ist nicht bekannt. Vorwiegend soll es sich um energiereiche Phosphatverbindungen handeln, deren Wirkung auf Fibroblastenkulturen von Lettré kürzlich untersucht wurde. Wie sich der Alterungsprozeß, der bei Lagerung insbesondere unter Luftzutritt beobachtet wurde, im einzelnen vollzieht, ist bisher ungeklärt. Tatsache ist jedoch, daß die proliferationsfördernde Wirkung des WGH in der Gewebekultur nach mehrwöchiger Lagerung deutlich abnimmt. Die im WGH wirksamen Substanzen sind sicher nicht mit den im Embryonalextrakt enthaltenen Stoffen identisch; denn sie vermochten in Gewebekulturen nicht die Funktion des Embryonalextraktes zu übernehmen.

Trotz der mit den Wuchsstoffen sicher nachgewiesenen Proliferationsförderung ist es nicht gelungen, die Entdifferenzierung der Knochenmarkszellen in vitro zu verhindern. Bis zu einem gewissen Grade war es durch Zusatz von T-Vitamin und Wundgranulationsextrakt möglich, die Rundzellen länger in der Kultur lebend zu halten. Eine Ausreifung, wie sie bei den Megaloblasten im Perniciosamark nach Zugabe von Vitamin B 12 auch in vitro beobachtet werden konnte, ließ sich nur bedingt erzielen. Es ist allerdings fraglich, ob für die weiße Reihe ein dem Vitamin B 12 entsprechender Reifungsfaktor überhaupt existiert. Vielleicht handelt es sich auch um eine Kombination mehrerer Substanzen, die in entsprechendem Mischungsverhältnis erst voll zur Wirkung kommen.

Zusammenfassung

An 511 Ratten- und 112 Meerschweinchenknochenmarkskulturen wurde der Einfluß des Pflanzenwuchsstoffes 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure auf das Zellwachstum in vitro geprüft. 1:400 hemmte das Wachstum. Bei einer Konzentration von 1:4000 war bereits eine proliferationsfördernde Wirkung vorhanden, die mit steigender Verdünnung weiter zunahm. Eine gesteigerte Differenzierung der Rundzellen wurde nicht beobachtet. Die Lebensdauer der Kulturen nach Wuchsstoffzusatz war deutlich verlängert.

Zu ähnlichen Ergebnissen führte die Gabe von Aminocapronsäure in Rattenknochenmarkskulturen. Die größte Vitalitätssteigerung wurde bei Konzentrationen von 1:40000—1:400000 beobachtet.

Mit dem Wirkstoffkomplex T-Vitamin Goetsch ließ sich an einer Versuchsreihe von 630 Rattenknochenmarkskulturen eine Verlängerung der Lebensdauer insbesondere der mehr oder weniger differenzierten Rundzellen erzielen.

Die Wirkung des Wundgranulationsextraktes WGH Solco wurde an 428 Ratten- und 320 Meerschweinchenknochenmarkskulturen untersucht. Bei Konzentrationen von 1:4—1:40 ergab sich eine Zunahme vorwiegend der eosinophilen Granulocyten.

Literatur

[1] Bauer, K. F.: Methodik der Gewebezüchtung. Stuttgart: S. Hirzel 1954. — [2] Ber, A.: Endokrinologie (Lpz.) **30**, 329 (1953). — [3] Carrel, A.: J. of Exper. Med. **15**, 165 (1912). — [4] Carrel, A.: J. of Exper. Med. **15**, 516 (1912). — [5] Fischer, A.: Gewebezüchtung. München 1930. — [6] Fresen, O.: Virchows Arch. **315**, 672 (1947). — [7] Friederici, L.: Fol. haemat. (Lpz.) im Druck. — [8] Gram, H. G., u. H. W. Schlipköter: Ärztl. Forsch. **1953** I/97. — [9] Goetsch, W.: Österr. zool. Z. **3**, 140 (1951). — [10] Hansch, C., R. M. Muir and R. L. Metzenberg jr.: Plant Physiol. **26**, 812 (1951). — [11] Henderson, J. H. M., J. H. Miller and D. C. Desse: Science (Lancaster, Pa.) **120**, 710 (1954). — [12] Knoth, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 501 (1952). — [13] Lohding, M.: Ärztl. Wschr. **5**, 826 (1950). — [14] Ramseyer, M., et R. M. du Pan: Arch. exper. Zellforsch. **20**, 117 (1937). — [15] Snedecor: Statistical Methods. The Iowa State College Press 1950. — [16] Söding, H.: Die Wuchsstofflehre. Stuttgart: Thieme 1952. — [17] Staudenmayer, Th.: Naturwissenschaften **41**, 67 (1954). — [18] Stevenson, E. C., and J. W. Mitchell: Science (Lancaster, Pa.) **101**, 642 (1945). — [19] Wacker, A., W. Dellweg u. E. Rowold: Klin. Wschr. **29**, 780 (1951). — [20] Weintraub, R. L.: Agricult. and Foot Chem. **1**, 250 (1953). — [21] v. Witsch, H., u. H. Kasperlik: Naturwissenschaften **40**, 294 (1953).

Prof. Dr. R. Duesberg, Mainz, Med. Poliklinik d. Johannes Gutenberg-Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 361—366 (1956)

Aus der Pharmakologischen Abteilung
der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen
(Leiter: Prof. Dr. Dr. W. Koll)

Die Erregbarkeit des Halsganglion der Ratte durch Pharmaka

Von
Hans Kaller

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Januar 1956)

In einer früheren Arbeit (Kaller 1956) wurde berichtet, daß es nicht möglich ist, am oberen Halsganglion der Ratte durch Nicotin Erregungen auszulösen. Um festzustellen, ob dieses Fehlen der Erregung nur beim Nicotin in Erscheinung tritt, oder ob es sich bei der fehlenden oder erschwerten Erregbarkeit durch Pharmaka um eine spezielle Eigenschaft des *Ratten*-Ganglion handelt, wurde eine Reihe von Substanzen geprüft, von denen bekannt ist, daß sie am Halsganglion der *Katze* erregend wirken. (Literatur bei Konzett u. Rothlin 1953 und Zaimis 1955.) Es wurden untersucht: Acetylcholin, Tetramethylammonium (TMA), Dimethylphenylpiperazin (DMPP), Veratrin und Kaliumchlorid.

Methodik

Alle Substanzen wurden zunächst durch *lokale* Applikation auf das Ganglion geprüft. Da bei dieser Versuchsanordnung (Kaller 1955) die Reaktionslage des Ganglion auch bei längerer Versuchsdauer recht stabil ist, gelangt man rasch zu eindeutigen und wiederholbaren Ergebnissen. Die Versuchstechnik wurde dadurch ergänzt, daß der N. facialis von einem Hautschnitt hinter dem Ansatz der Ohrmuschel aus durchtrennt wurde. Hierdurch wird die Lidmuskulatur gelähmt, und Lidschläge oder Lidspasmen, welche die Registrierung stören können, treten nicht mehr auf.

Da auf Grund prinzipieller Erwägungen die Methode der lokalen Applikation nur begrenzt über die qualitativen und quantitativen Verhältnisse Auskunft geben kann, wurden die Substanzen weiterhin *intraarteriell* infundiert (Kaller 1956). Bei den bisherigen Untersuchungen wurden qualitativ im Wirkungsbild der Substanzen *keine Unterschiede* zwischen den Versuchsanordnungen gesehen. In quantitativer Hinsicht waren die zur Erzielung gleicher Effekte notwendigen Konzentrationen bei lokaler Applikation etwa 5—10mal höher als die Konzentrationen bei intraarterieller Infusion.

Ergebnisse

In der Regel ergibt sich bei den geprüften Substanzen das gleiche Bild wie beim Nicotin: Erregende Wirkungen sind *nicht* festzustellen. Gelegentlich (besonders am Anfang des Versuches) zeigen sich geringfügige

und kurzdauernde Erregungen, die jedoch kaum jemals stärker ausgebildet sind als spontan auftretende Schwankungen der Ausgangslage des Orbitalmuskels, und die am gleichen Präparat meist nicht wiederholbar sind. Verzichtet man im Versuch auf die regelmäßige präganglionäre Reizung, so kann man relativ häufiger Erregungen sehen. Aber auch unter diesen Bedingungen bleiben die erregenden Effekte im allgemeinen geringfügig.

Bei genügend hoher Dosierung bewirken die Substanzen eine Blockade des Ganglion. Für die einzelnen Stoffe findet man bei intraarterieller Infusion die folgenden total blockierenden Grenzkonzentrationen (g/ml):

KCl (zusätzlich zur Tyrodelösung)	5×10^{-3}
Acetylcholinchlorid	10^{-3}
Dimethylphenylpiperazinjodid .	10^{-4}
Tetramethylammoniumchlorid . .	5×10^{-5}
Veratrin-Base	5×10^{-5}
Nicotin-Base	10^{-5}

Die angegebenen Grenzkonzentrationen können sich — je nach der Empfindlichkeit des Tieres — um den Faktor 2—4 nach oben oder unten

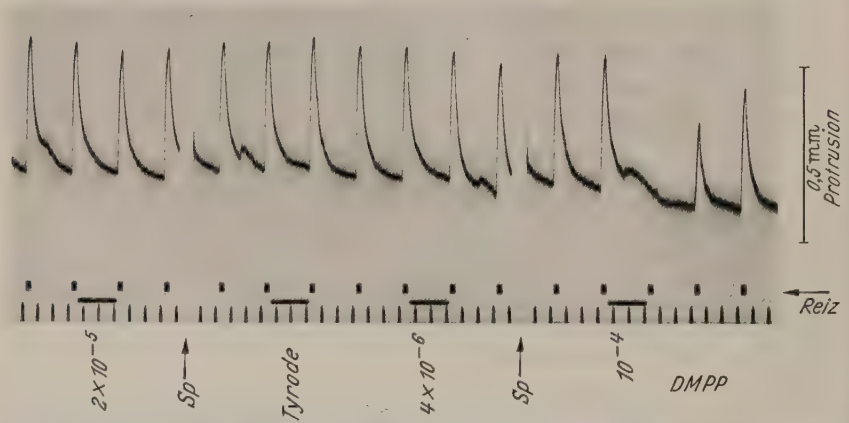


Abb. 1. Intraarterielle Infusion verschiedener Konzentrationen (g/ml) von Dimethylphenylpiperazinjodid (DMPP). In keinem Dosierungsbereich sind erregende Wirkungen zu sehen. Blockade der Erregungsübertragung bei 10^{-4}. Infusionsgeschwindigkeit 0,01 ml/min. Präganglionäre Reizung: Frequenz 4 Hz, Impulsdauer 0,2 msec, Stromstärke 1,5 mA, Reizdauer jeweils 20 sec. Zeitschreibung 1 min. *Sp*-Spülung der Infusionskanüle durch Injektion von 0,1 ml Tyrodelösung, Kymo 6 min halt

verschieben. Bemerkenswert ist die Unempfindlichkeit des Rattenganglion gegenüber Acetylcholin. Nach Blockade durch KCl oder Veratrin kommt es oft nicht mehr zur vollständigen Erholung des Ganglion. — Die Abb. 1 zeigt als Beispiel die Infusion von DMPP. In keinem Dosierungsbereich treten erregende Effekte auf. (Vgl. auch Kaller 1956: Nicotin.)

Läßt man nichtblockierende Konzentrationen der Substanzen auf das Ganglion einwirken, so kann man relativ häufig eine Erregbarkeitssteigerung beobachten, die sich darin äußert, daß die Protrusion bei präganglionärer Reizung größer wird. Diese Effekte sind nicht sehr deutlich ausgebildet, können nur bei einem Teil der Tiere ausgelöst werden und sind auch am gleichen Tier nicht mit Sicherheit wiederholbar.

Unter den untersuchten Substanzen nimmt das Acetylcholin eine gewisse Sonderstellung ein: Es gelingt bei einem nicht unerheblichen

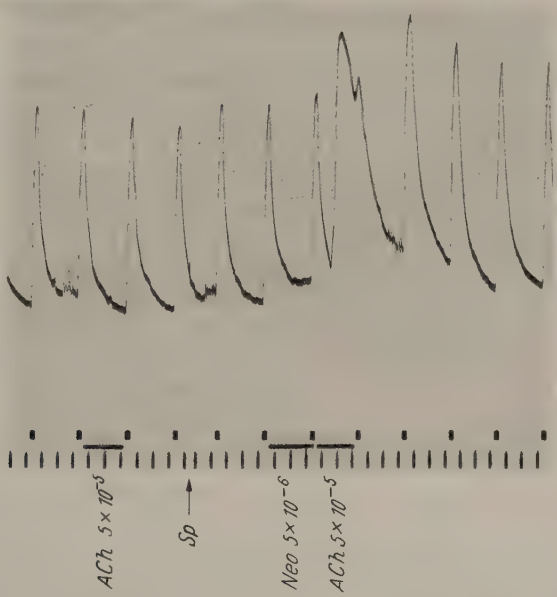


Abb. 2. Auslösung einer Erregung durch Acetylcholinchlorid (ACh) nach Vorbehandlung mit Neostigmin-sulfat (Neo). Daten wie Abb. 1. Intraarterielle Infusion

Teil der Tiere, mit *sehr hohen* Konzentrationen (über 10^{-4} g/ml intraarteriell) Erregungen auszulösen. Daneben gibt es aber auch Tiere, bei denen man das Ganglion mit Acetylcholin blockieren kann, ohne daß vorher eine Erregung auftritt. Durch Vorbehandlung mit Physostigmin oder Neostigmin (Prostigmin) läßt sich die Empfindlichkeit gegenüber Acetylcholin steigern. Die zur Erregung notwendigen Acetylcholin-Konzentrationen sind allerdings auch dann noch — im Verhältnis zu den am Katzen-Ganglion notwendigen Konzentrationen — sehr hoch (über 2×10^{-5}). Die Abb. 2 zeigt die Auslösung einer Acetylcholin-Erregung nach Neostigmin-Vorbehandlung an einem Ganglion, das vorher auch durch höchste Konzentrationen nicht erregt wurde. Nach Abklingen der Erregung gibt sich in der Vergrößerung der Protrusionen auf präganglionären Reiz eine Erregbarkeitssteigerung zu erkennen. Vom

Physostigmin-salicylat benötigt man etwa 2—3mal höhere Konzentrationen als vom Neostigmin-sulfat. — Die Acetylcholin-Erregungen nach Vorbehandlung mit Physostigmin oder Neostigmin sind bei vielen Tieren nicht beliebig oft wiederholbar, besonders in Versuchen mit regelmäßiger präganglionärer Reizung.

Als Eigenwirkung von Neostigmin und Eserin ist bei Konzentrationen bis zu 10^{-4} intraarteriell gelegentlich eine Erregbarkeitssteigerung bei präganglionärer Reizung zu sehen. Im Bereich zwischen 10^{-4} und 10^{-3} treten blockierende Effekte auf.

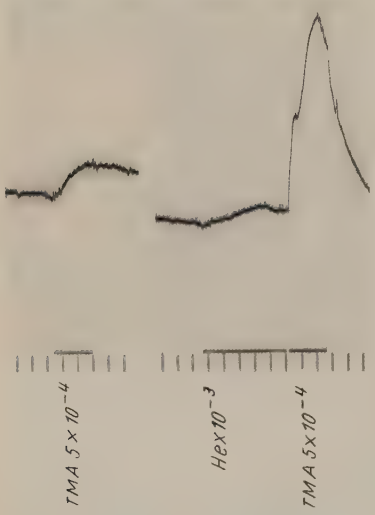


Abb. 3. Unspezifische Verstärkung des erregenden Effektes von Tetraaethylammoniumchlorid (TMA) durch Vorbehandlung mit Hexamethoniumchlorid (Hex). 15 min Pause zwischen den Versuchsperioden. *Lokale* Applikation der Substanz-Lösungen

Es gibt Substanzen, welche die pharmakologische Erregbarkeit des Ganglion *unspezifisch* steigern. Eine dieser Substanzen ist das Hexamethonium. Nach Vorbehandlung mit Hexamethonium kann man mit Acetylcholin, DMPP, TMA und Nicotin Erregungen auslösen. (Veratrin und KCl konnten wegen der auftretenden irreversiblen Schäden nicht exakt geprüft werden.) Wenn nach mehrmaliger Behandlung des Ganglion mit Cholinesterasehemmer + Acetylcholin die Reaktion auf diese Behandlung zunehmend geringfügiger wird und schließlich nicht mehr auslösbar ist, gelingt es dennoch, nach Hexamethonium-Vorbehandlung mit den verschiedenen Substanzen (bei einigen Tieren auch mit Acetylcholin!) Erregungen auszulösen. Diese Tatsache weist darauf hin, daß den Steigerungen der pharmakologischen Erregbarkeit durch Hexamethonium und durch Eserin bzw. Neostigmin verschiedene Wirkungsmechanismen zugrundeliegen, und unterstreicht die Spezifität der Wirkung der Cholinesterasehemmer. Die Abb. 3 zeigt eine Verstärkung der TMA-Erregung nach Hexamethonium-Vorbehandlung.

Diskussion

Paton und Perry (1953) haben zum Ausdruck gebracht, daß man mit der Möglichkeit rechnen müsse, daß eine Depolarisation nicht immer zwangsläufig von einer Erregung begleitet ist. Die Depolarisation könne nämlich so langsam ablaufen, daß kein exzitatorischer Effekt sichtbar wird. Die Autoren beschreiben damit offenbar die als Akkomodation

gedeutete Möglichkeit des „Einschleichens" eines pharmakologischen Reizes.

Man darf wohl von der Annahme ausgehen, daß die hier untersuchten Substanzen auch am Halsganglion der Ratte, ebenso wie an dem der Katze eine Depolarisation der Membranen bewirken und auf diese Weise auch die Erregungsübertragung blockieren können. Wollte man das Fehlen einer manifesten Erregung durch einen bekannten Begriff beschreiben, so könnte man sagen: Das Ratten-Ganglion besitzt die Eigenschaft, relativ leicht zu akkomodieren. Hierbei muß offen bleiben, was man sich reaktionskinetisch unter der Akkomodation vorzustellen hat.

Die relative Unempfindlichkeit der Ratte gegenüber Acetylcholin scheint nicht nur am Halsganglion, sondern auch in anderen Versuchsanordnungen nachweisbar zu sein. So fanden z. B. Kraupp, Stormann u. Honetz bei Versuchen an den isoliert durchströmten Hinterextremitäten, daß zur Auslösung einer nachweisbaren Kalium-Freisetzung extrem hohe Acetylcholindosen (über 10 mg) notwendig waren.

Feldberg und Vartiainen (1935) benötigten am Katzen-Ganglion zur Aktivierung der Reaktion auf Acetylcholin die Eserin-Konzentrationen 1 bis 2×10^{-6}. Am Ratten-Ganglion sind die etwa 10fachen Eserin-Konzentrationen erforderlich, es besteht also eine relative Unempfindlichkeit gegenüber Eserin. Dabei ist aber die Wirkung dieses Stoffes — ebenso wie die des Neostigmin — streng spezifisch gegenüber der Acetylcholin-Wirkung, im Gegensatz zum Halsganglion der Katze, bei dem Feldberg u. Vartiainen auch eine unspezifische sensibilisierende Wirkung feststellen konnten.

Eserin- oder Neostigmin-Konzentrationen bis 10^{-4} g/ml intraarteriell beeinflussen am Ratten-Ganglion die Erregungsübertragung nicht oder nur im Sinne einer Erregbarkeitssteigerung bei präganglionärer Reizung. Man kann erwarten, daß bei diesen Konzentrationen die Cholinesterasen weitgehend gehemmt sind. In diesem Zusammenhang sei auf die Untersuchungen von Holaday, Kamijo u. Koelle (1954) am isolierten Halsganglion der Ratte hingewiesen: Die Erregungsübertragung war bei histochemisch nachgewiesener kompletter Cholinesterasehemmung durch Diisopropylfluorophosphat (DFP) nicht beeinflußt oder nur partiell blockiert.

Für die Steigerung der pharmakologischen Erregbarkeit des Rattenganglion nach Hexamethonium gibt es bisher keine Erklärung. Man könnte die Annahme machen, daß die Akkomodationsfähigkeit des Ganglion unspezifisch herabgesetzt wird. Erwähnt sei der Befund von Reinert u. Perry (1955), daß Hexamethonium am Katzen-Ganglion nach chronischer Denervierung erregend und erregbarkeitssteigernd wirkt.

Summary

Normally the superior cervical ganglion of the rat is not stimulated by acetylcholine, tetramethylammonium (TMA), dimethylphenylpiperazine (DMPP), nicotine, KCl and veratrine. If administered in sufficiently high doses the ganglionic transmission is blocked. The failure of excitations by drugs is supposed to be caused by a relatively high rate of accomodation in the ganglion of the rat. — After preadministration of eserine or neostigmine it is possible to stimulate the ganglion by

acetylcholine. The preadministration however has no influence on the excitability of the ganglion cells to other depolarizing drugs. — Hexamethonium non-specifically raises the excitability to chemical stimulants.

Literatur

Feldberg, W., and A. Vartiainen: J. of Physiol. **83**, 103 (1935). — Holaday, D. A., K. Kamljo and G. B. Koelle: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **111**, 241 (1954). — Kaller, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 104, 474 (1955); Arch. internat. Pharmacodynamie **105**, (im Druck) (1956). — Konzett, H., u. E. Rothlin: Experientia (Basel) **9**, 405 (1953). — Kraupp, O., H. Stormann u. H. Honetz: persönliche Mitteilung. — Paton, W. D., and W. L. M. Perry: J. of Physiol. **119**, 43 (1953). — Reinert, H., u. W. L. M. Perry, zit. n. Reinert (Diskussionsbemerk.): Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 102 (1955). — Zaimis, E.: J. of Pharmacy a. Pharmacol. **7**, 497 (1955).

Dr Hans Kaller, Pharmakol. Abtlg. d. Med. Forschungsanstalt d. Max-Planck-Gesellschaft Göttingen

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 367—370 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Münster i. W.
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. A. Loeser)

Choleretische Wirkung neuerer 1,3-Butandiol-Derivate

Von
Gerhard Bornmann

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Dezember 1955)

Nachdem sich in früheren Untersuchungen verschiedene Äther mehrwertiger Alkohole, insbesondere die des zweiwertigen Alkohols 1,3-Butandiol, als wirksame Choleretica erwiesen hatten, erschien es sinnvoll und zweckmäßig, die galletreibende Wirkung auch anderer Abkömmlinge des 1,3-Butandiol zu prüfen. Zur Verfügung standen verschiedene Derivate, bei denen in 2- bzw. in 2- und 4-Stellung Methyl- oder Äthylgruppen unter Schonung der in 1- und 3-Stellung befindlichen OH-Gruppen eingeführt waren*.

Methodik

In Urethannarkose (1,2 g Äthylurethan/kg subcutan) — bei Meerschweinchen und Kaninchen während der Laparotomie zusätzlich Äther — wurde nach einer Hungerzeit von 12—15 Std männlichen Albinoratten von 200—400 g, Meerschweinchen von 500—800 g und Kaninchen von etwa 4000 g Gewicht eine Kanüle in den Ductus choledochus eingebunden. Bei Meerschweinchen und Kaninchen war zuvor der Ductus cysticus abgebunden worden. Die Zahl der austretenden Galletropfen wurde elektrisch registriert. Eine Reinjektion der abgeflossenen Galle erfolgte nur bei Kaninchen und Meerschweinchen.

Sobald sich der Tropfenfluß der Galle während etwa 1 Std als regelmäßig gezeigt hatte, wurde die Prüfsubstanz den Ratten durch eine während der Operation eingelegte dünne Schlundsonde in den Magen, Meerschweinchen und Kaninchen durch eine in das Duodenum eingebundene Kanüle verabfolgt.

Die Versuche wurden in einem Raum von 21—22° C Temperatur während der Monate Januar bis Juni 1955 durchgeführt.

Ergebnisse

Alle untersuchten Butandiol-Abkömmlinge — farblose, klare, mit Wasser mehr oder minder gut mischbare Flüssigkeiten — hatten bei Ratten eine kräftige choleretische Wirkung. Werden die Prüfsubstanzen nach dem Grad ihrer Wirksamkeit geordnet, so steht das 2,2,4-Trimethylbutandiol-1,3 (oder 2,2-Dimethylpentandiol) an der Spitze, ihm folgen

* Den Chemischen Werken Hüls sei für Überlassung der Versuchsmengen gedankt.

2-Äthyl-4-Methylbutandiol-1,3 (oder 2-Äthylpentandiol), 2,4-Dimethylbutandiol-1,3 (oder 2-Methylpentandiol), 2-Äthylbutandiol-1,3 und schließlich 2-Methylbutandiol-1,3. Das gilt sowohl für die unverdünnten Substanzen, die in einer Dosis von 5,0 cm³/kg K.-gew. verabreicht wurden, als auch für die Verdünnungen 1:5, deren zugeführte Menge ebenfalls 5,0 cm³/kg K.-gew. betrug. Als Vergleichssubstanz diente die unter dem Namen „Decholin" handelsübliche 20%ige Lösung von dehydrocholsaurem Natrium, unverdünnt oder ebenfalls mit Aqua dest. 1:5 verdünnt.

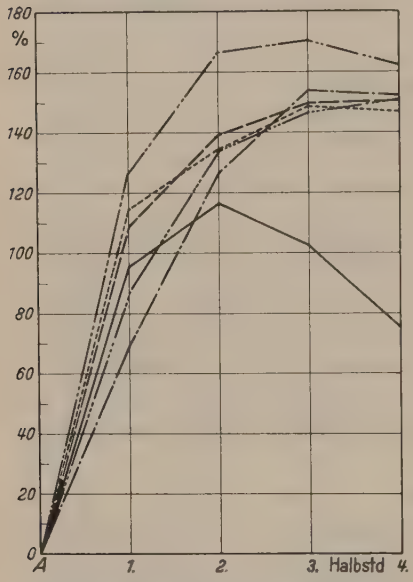


Abb. 1. Steigerung des Galleflusses von Ratten nach Einwirkung von unverdünntem 2,2,4-Trimethylbutandiol-1,3 (— · · — · ·), 2-Äthyl-4-Methylbutandiol-1,3 (— — —), 2,4-Dimethylbutandiol-1,3 (— · — · —), 2-Äthylbutandiol-1,3 (--------), 2-Methylbutandiol-1,3 (— · · · — · · ·) oder — zum Vergleich — „Decholin" (——) in Prozent des Ausgangswertes. Dosis: 5,0 cm³/kg Ratte (Schlundsonde). Jeder Punkt der Kurven entspricht dem Mittelwert aus 5 Versuchen. Ordinate: Prozent des Ausgangswertes. Abszisse: Halbstunden nach Zufuhr der Prüfsubstanz. *A* Ausgangswert (eine Halbstunde vor Zufuhr der Prüfsubstanz)

Im einzelnen gehen die Ergebnisse aus Abb. 1 und 2 hervor, wobei die erhebliche Steigerung des Galleflusses durch 2,2,4-Trimethylbutandiol-1,3 — für die unverdünnte Substanz beispielsweise mit einem Maximum von + 170,5% gegenüber einem Decholin-Maximum von + 116,7% (Mittelwerte von je 5 Tieren) — auffällt. Weiterhin läßt sich aus den Abbildungen entnehmen, daß die Wirkung der Butandiol-Derivate praktisch gleichzeitig mit der des Decholins einsetzt, ihr Maximum aber später erreicht, im ganzen stärker ist und länger anhält. Letzteres ergibt sich noch deutlicher in einigen 8-Std-Versuchen mit unverdünnten Substanzen, bei denen die Substitutionsprodukte des 1,3-Butandiol während der vollen Versuchszeit nachweisbar wirkten, im Gegensatz zum Decholin, dessen Wirkung in der halben Zeit abgeklungen war.

Über die Qualität der unter dem Einfluß der substituierten Butandiole abgesonderten Galle läßt sich auf Grund von Trockengehaltsbestimmungen sagen, daß die je Zeiteinheit abgegebene Menge an Trockensubstanz zwar nicht in gleichem Maß zunimmt wie die Menge an Gallenflüssigkeit, daß sie aber gegenüber den Ausgangswerten — und gegenüber Ratten, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten — wesentlich erhöht ist. Verglichen mit Galle, welche unter dem Einfluß

von Decholin abgesondert wird, ist der Unterschied im Trockengehalt für einzelne Halbstunden-Werte manchmal nur gering; dagegen liegt die Gesamtausscheidung an Trockensubstanz während der 6stündigen Versuche bei den Ratten, welche die Butandiol-Derivate erhalten hatten, deutlich höher als bei den Decholin-Tieren.

Ähnlich wie die früher untersuchten Äther hatten nach intraduodenaler Applikation auch die beschriebenen alkylierten Butandiole bei Meerschweinchen eine deutliche, bei Kaninchen dagegen keine Wirkung. Hier liegt ein Unterschied zum Decholin-Effekt, der bei beiden Tierarten nachweisbar ist.

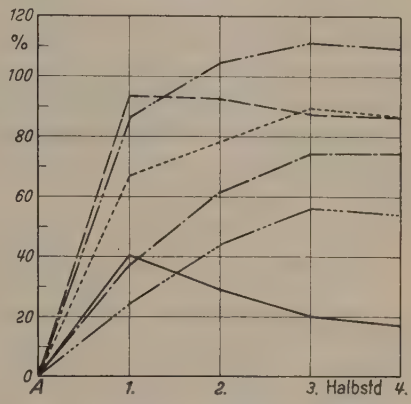


Abb. 2. Steigerung des Galleflusses von Ratten nach Einwirkung von 1 : 5 mit Aqua dest. verdünntem 2,2,4-Trimethylbutandiol-1,3 (—··—··), 2-Äthyl-4-Methylbutandiol-1,3 (— — —), 2,4-Dimethylbutandiol-1,3 (— · — · —), 2-Äthylbutandiol-1,3 (---------), 2-Methylbutandiol-1,3 (— · · · —) oder — zum Vergleich — „Decholin" (———) in Prozent des Ausgangswertes. Dosis: 5,0 cm³/kg Ratte (Schlundsonde). Jeder Punkt der Kurven entspricht dem Mittelwert aus 5 Versuchen. Ordinate: Prozent des Ausgangswertes. Abszisse: Halbstunden nach Zufuhr der Prüfsubstanz. *A* Ausgangswert (eine Halbstunde vor Zufuhr der Prüfsubstanz)

Für die Beurteilung einer etwaigen praktischen Brauchbarkeit der geprüften 1,3-Butandiol-Derivate ist von entscheidender Bedeutung, ob und in welchem Maß diese Verbindungen toxisch sind. Zur Information sei das Ergebnis der Versuche an Mäusen, welche zur Ermittlung der mittleren tödlichen Dosis (LD 50) vorgenommen wurden, angeführt (Tab. 1).

Tabelle 1. *LD 50 von Mäusen nach oraler Zufuhr der Prüfsubstanzen bei einer Beobachtungszeit von 24 Std (nach* Kärber, *berechnet nach* Burn*)*

Prüfsubstanz	LD 50 in cm³/kg K.-gew.
2,2,4-Trimethylbutandiol-1,3	6,0
2-Äthyl-4-Methylbutandiol-1,3	6,3
2,4-Dimethylbutandiol-1,3	7,2
2-Äthylbutandiol-1,3	8,4
2-Methylbutandiol-1,3	15,7

Bei dem Ergebnis fällt auf, daß die am stärksten choleretisch wirkende Substanz auch die höchste Toxicität hat; im ganzen liegen die mittleren tödlichen Dosen aller untersuchten substituierten 1,3-Butandiole im Vergleich zur mittleren tödlichen Dosis von Decholin (20,3 cm³/kg K.-gew.) recht niedrig.

Zusammenfassung

Eine galletreibende Wirkung kommt nicht nur manchen Äthern des 1,3-Butandiol, sondern auch alkylierten Butandiolen zu. Ein besonders kräftiger Effekt wurde für das 2,2,4-Trimethylbutandiol-1,3 nachgewiesen; die untersuchten anderen Seitenketten-substituierten Abkömmlinge des 1,3-Butandiol wirkten ebenfalls galletreibend, aber in geringerem Maße. Der im Vergleich zum dehydrocholsauren Natrium (20%ige Lösung, „Decholin") stärkeren Wirksamkeit steht eine größere Toxicität gegenüber.

Literatur

Bornmann, G.: Arzneimittel-Forsch. **2**, 122 (1952).

Dr. Gerhard Bornmann, Münster/Westf., Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 371—376 (1956)

Aus der Forschungsabteilung der A/S Pharmacia, Kopenhagen

Curarewirkung quaternärer bis-Alkylammonium-Alkyl-Dicarbonsäure-Ester-Salze

Von

MARIANNE SCHILLING und J. G. A. PEDERSEN

(Eingegangen am 12. Januar 1956)

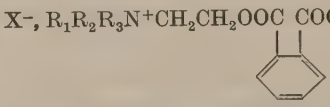
Unter den synthetischen Curarestoffen nehmen die bis-quaternären Dicarbonsäureester auf Grund ihrer durch hydrolytischen Abbau verursachten kurzen Wirkungsdauer einen hervortretenden Platz ein (BOVET u. BOVET-NITTI, 1949). Das Dijodmethylat des Di-(dimethylaminoäthyl)-Bernsteinsäureesters (Succinylcholin) erwies sich nach BOVET, BOVET-NITTI, GUARINO, LONGO u. MAROTTA (1949) als besonders spezifisch in seiner Curareaktivität. Auf Grund der Beobachtungen dieser Verfasser hinsichtlich der pharmakologischen Wirkungen dieses Stoffes schien es interessant, eine Reihe homologer Verbindungen mit Hinblick auf ihre curarisierenden Eigenschaften zu untersuchen. Der Hauptzweck unserer Untersuchungen war es dabei, eine eventuelle Beziehung zwischen chemischer Struktur und Art und Größe der Curareaktivität nachzuweisen (vgl. ROSNATI u. BOVET, 1951, sowie THESLEFF u. UNNA, 1954).

Die von uns untersuchten bis-Ammoniumalkyl-Dicarbonsäureester wurden in unserem Laboratorium hergestellt (CHRISTIANSEN, HANSEN u. FAKSTORP, 1953). Es waren folgende chemische Variationen im Molekül, deren Einfluß auf die pharmakologische Wirkung untersucht wurde: Der Abstand zwischen den beiden quaternären Gruppen, vor allem in Systemen mit Doppelbindungen, die Art und Verteilung der Substituenten am Stickstoff, und hierbei speziell in den Fällen, wo die beiden quaternären Gruppen verschieden substituiert waren, und schließlich der Einfluß, den eine stark verzweigte hydro-aromatische Säure auf Wirkung und Wirkungsdauer haben mochte.

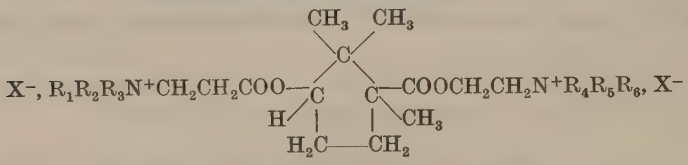
Die untersuchten Verbindungen können in folgende 3 Hauptgruppen zusammengefaßt werden:

1. bis-Ammoniumalkyl-Bernsteinsäureester:
   $X^-, R_1R_2R_3N^+CH_2CH_2COOCH_2 — CH_2COOCH_2CH_2N^+R_4R_5R_6, X^-$
2. bis-Ammoniumalkyl-Maleinsäureester:
   $X^-, R_1R_2R_3N^+CH_2CH_2COOCH = CHCOOCH_2CH_2N^+R_4R_5R_6, X^-$

und bis-Ammoniumalkyl-o-Phthalsäureester:



3. bis-Ammoniumalkyl-Camphersäureester:



Art und Verteilung der Substituenten am Stickstoff, $R_1R_2R_3$ bzw. $R_4R_5R_6$ gehen aus Tab. 1 und 2 hervor. Die zu untersuchenden Substanzen werden als Iodide oder Bromide verabreicht.

Methodik

1. Kaninchen, „head-drop", (intravenös). Es wurde die „head-drop"-Methode von Varney, Linegar u. Holaday (1949) benutzt. Die Größe der „head-drop"-Dosen wurde in einer Reihe orientierender Versuche festgelegt. Die Stoffe wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. (Konzentration: 5 mg/ml und 10 mg/ml.) Je 5 Kaninchen (männlich, Durchschnittsgewicht 3 kg) wurden intravenös mit Dosen zwischen 0,4 und 6 mg/kg injiziert. Es wurde die Zeit in Minuten von der Injektion bis zum Eintreten des „head-drop", sowie bis zur völligen Restitution, gemessen. In einigen Fällen, wo Lähmung der Atemmuskulatur auftrat, wurde künstliche Atmung mit Hilfe von Carbogen angewandt.

2. Mäuse, „inclined screen" (intraperitoneal). An weißen Mäusen (männlich, Durchschnittsgewicht 20 g) wurde die Toxicität und die lähmende Dosis bestimmt. Es wurden intraperitoneale Injektionen gegeben, und die Zeit in Minuten bis zum Eintreten der Lähmung gemessen. Folgende Versuchsanordnung diente zur Bestimmung der lähmenden Dosis: Nach der Injektion wurden die Tiere auf eine mit Drahtnetz bespannte schiefe Ebene gesetzt (Winkel 50°), auf welcher sie sich vor Beginn der Lähmung recht gut bewegen konnten. Sobald die curarisierende Wirkung begann, konnten die Mäuse sich nicht mehr auf dem schrägen Drahtnetz halten und glitten herab. Jede Dosis wurde je 5 Mäusen injiziert. Der Dosenbereich erstreckte sich von einer Anfangsdosis mit 0% Lähmung bis zu einer Maximaldosis mit 100% Lähmung.

Die effektive Dosis, ED_{50} sowie die LD_{50} wurde nach der Methode von Kärber (1932) berechnet. Bei den meisten Stoffen trat die tödliche Wirkung erst nach 100% Lähmung auf.

Ergebnisse

1. „Head-drop"-Versuche. „Head-drop" wurde folgendermaßen definiert: Nach erfolgter intravenöser Injektion trat die Lähmung derjenigen Nackenmuskeln auf, welche den Kopf stützen. Das Kaninchen legte den Kopf flach auf die Unterlage. Als weitere Symptome wurden beobachtet: Muskelschwäche, besonders in den Hinterbeinen, Zittern der Glieder, in einigen Fällen Respirationslähmung.

„Head-drop"-Dosis, sowie Latenzzeit und Wirkungsdauer der verschiedenen Stoffe sind in Tab. 1 angegeben.

Succinylcholin und dessen Homologe zeigten übereinstimmend einen sehr deutlichen und scharfen Eintritt des oben beschriebenen „head-drop".

Die niedrigste „head-drop"-Dosis in der Reihe der Bernsteinsäureester wurde bei Succinylcholin gefunden (0,24 mg/kg). Bei den symmetrisch substituierten höheren Homologen wurde die Wirkungsdauer mit steigender Anzahl Äthylgruppen erheblich verlängert. Jedoch waren auch steigende Dosen erforderlich, um „head-drop" hervorzurufen.

Waren die Substituenten hingegen asymmetrisch angeordnet, dann waren Wirkungsdosis und Wirkungsdauer von der gleichen Größenordnung wie bei Succinylcholin, ohne bedeutende Abhängigkeit von der Anzahl Äthylsubstituenten.

In der Reihe der Maleinsäureester zeigte das dem Succinylcholin entsprechende Glied eine recht niedrige Aktivität, während die Wirkung des höheren Homologen von der gleichen Größenordnung war wie die des Succinylcholins, was die Bedeutung der Kettenlänge und der freien Drehbarkeit zeigt. Der kürzere C-C-Abstand und das weniger bewegliche System wird in dem höheren Homologen (58782) durch den größeren N-Substituenten kompensiert. Nach Verabreichung dieses Stoffes erfolgte im übrigen selbst bei recht niedrigen Dosen (herab bis zu 1 mg/kg) Lähmung der Respirationsmuskulatur.

Tabelle 1. X^-, $R_1R_2R_3N^+CH_2CH_2$-(Ester)-$CH_2CH_2N^+R_4R_5R_6$, X^-.
Weiße Kaninchen, intravenöse Injektion

Ester	Substituenten am Stickstoff						Subst. Nr.	Dosis mg/kg	Anzahl Versuchstiere	davon gelähmt	Mittlere Latenzzeit in min	Wirkungsdauer in min
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6						
Bernsteinsäure-	Me	Me	Me	Me	Me	Me	58351	0,24	8	7	0	2
	Me	Äth	Äth	Me	Äth	Äth	58581	4	4	4	2½	19
	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	58582	6	5	5	1	13
	Me	Me	Me	Me	Äth	Äth	58591	0,5	4	4	½	6
	Me	Me	Äth	Äth	Äth	Äth	58592	0.8	6	4	3	6
Maleinsäure-	Me	Me	Me	Me	Me	Me	58781	6	4	3	1	3
	Me	Me	Äth	Me	Me	Äth	58782	0,5	4	4	1	3
o-Phthalsäure-	Me	Me	Me	Me	Me	Me	58621	5	4	3	4½	3
	Me	Me	Äth	Me	Me	Äth	58622	1,6	4	4	6	18
	Me	Äth	Äth	Me	Äth	Äth	58631	1,6	5	4	7½	27
	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	58632	1,6	5	4	4	11
d-Camphersäure-	Me	Me	Me	Me	Me	Me	58601	1,6	5	4	5	25
	Me	Me	Äth	Me	Me	Äth	58602	0,5	5	5	6	25
	Me	Äth	Äth	Me	Äth	Äth	58611	0,6	5	5	2	48
	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	58612	0,4	5	5	1	60

Der „head-drop"-Effekt trat bei den Phthalsäureestern am wenigsten scharf hervor. Das niedrigste Homologe (58621) erzeugte keine deutliche Lähmung der Nackenmuskeln. Muskelzittern, Lähmung der Hinterbeine und allgemeine Schwäche wurden beobachtet. Auch in dieser Reihe trat der maximale Effekt bei den höheren Homologen auf, in Übereinstimmung damit, daß die Kettenlänge in diesen Verbindungen verglichen mit Succinylcholin etwas verkürzt ist, wenn auch weniger ausgeprägt als bei den Maleinsäureestern. Die mit Äthyl substituierten Derivate zeichneten sich durch eine längere Wirkungsdauer und Latenzzeit aus.

Die Camphersäureester zeigten durchweg eine hohe Curareaktivität. Sie waren besonders bemerkenswert wegen ihrer langen Wirkungsdauer (bis zu 1 Std). Dies ließe sich aus den besonderen sterischen Verhältnissen des Camphersäuremoleküls erklären, dessen zahlreiche Methylgruppen die Verbindung für die Spaltung durch Cholinesterase sterisch schwer zugänglich machen. Bei dieser Gruppe hydroaromatischer Ester trat der Einfluß der Äthylsubstituenten auf die Curareaktivität besonders hervor. Die wirksame Dosis fiel mit steigender Anzahl Äthylgruppen, die Latenzzeit wurde vermindert und die Wirkungsdauer verlängert. Dieses kann man nicht ohne weiteres als eine Folge optimaler Abstände zwischen den beiden prosthetischen Gruppen ansehen, sondern ist vermutlich anderen Ursachen zuzuschreiben. Die relative Stabilität gegenüber hydrolytischem Abbau ist sicher von Bedeutung. Das Verhältnis zwischen der relativen Elektronenaffinität der Methyl- und Äthylgruppen spielt ebenfalls für die Affinität des Moleküls zur Receptorstelle und damit für die Aktivität eine Rolle. Ferner müßte man darauf hinweisen, daß sich der Wirkungstypus üblicherweise mit steigender Anzahl Äthylgruppen vom Decamethonium- zum Tubocurarintypus ändert. Die hohe Aktivität der Camphorate wird möglicherweise dadurch verursacht, daß beide Wirkungsmechanismen hier ineinandergreifen.

2. Lähmungsversuche bei Mäusen: ED_{50}, LD_{50} und die mittlere Latenzzeit bei 100% Lähmung gehen aus Tab. 2 hervor.

Auch hier war das Eintreten der Lähmung am schärfsten bei den Bernsteinsäurederivaten zu beobachten. Die unsymmetrischen Bernsteinsäureester zeigten entsprechend den Kaninchen-Versuchen auch bei Mäusen einen außerordentlich starken Effekt (niedrige Effektivdosis, kurze Latenzzeit). Eine Abhängigkeit der Curareaktivität von der Anzahl der Äthylsubstituenten trat nicht klar hervor. Der an beiden Stickstoffatomen mit je 3 Äthylgruppen substituierte Bernsteinsäureester (58582) rief keine Lähmung bei niedrigen Dosen hervor. Bei hohen Dosen (48 mg/kg) fielen die lähmende und die toxische, respirationslähmende Dosis zusammen. In Analogie mit den „head-drop"-Versuchen konnte auch bei Mäusen keine eindeutige Curarewirkung der o-Phthalate beobachtet werden, da die Tiere durch Krämpfe von dem Drahtnetz

Tabelle 2. X^-, $R_1R_2R_3N^+CH_2CH_2$-(Ester)-$CH_2CH_2N^-R_4R_5R_6$, X^-.
Weiße Mäuse, intraperitoneale Injektion

Ester	Substituenten am Stickstoff						Subst. Nr.	ED_{50} mg/kg	LD_{50} mg/kg	Mittlere Latenzzeit bei 100% Lähmung in min
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6				
Bernsteinsäure-	Me	Me	Me	Me	Me	Me	58351	3,5	5,0	2
	Me	Äth	Äth	Me	Äth	Äth	58581	17	30	9
	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	58582	48	48,5	9
	Me	Me	Me	Me	Äth	Äth	58591	5,85	16	2½
	Me	Me	Äth	Äth	Äth	Äth	58592	9,75	24	5
Maleïnsäure-	Me	Me	Me	Me	Me	Me	58781	17	35	4½
	Me	Me	Äth	Me	Me	Äth	58782	30	48	2
o-Phthalsäure-	Me	Me	Me	Me	Me	Me	58621	125	145	2
	Me	Me	Äth	Me	Me	Äth	58622	14	21	2
	Me	Äth	Äth	Me	Äth	Äth	58631	12	16	9½
	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	58632	18	25	10
d-Camphersäure-	Me	Me	Me	Me	Me	Me	58601	7	10	6
	Me	Me	Äth	Me	Me	Äth	58602	3	4	17
	Me	Äth	Äth	Me	Äth	Äth	58611	2	4	13
	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	Äth	58612	2,35	3,75	8

geworfen wurden. Auch in dieser Versuchsgruppe waren die Camphorate in ihrer Wirkung am interessantesten. Der Zeitraum bis zum Beginn der Lähmung war außerordentlich lang. Die Rolle der Anzahl Äthylgruppen war hier sehr deutlich: die lähmende Dosis wurde durch steigende Anzahl Äthylsubstituenten erniedrigt, die Latenzzeit verkürzt.

Zusammenfassung

4 Homologe des Succinylcholins, 2 Di-Ammoniumalkyl-Estersalze der Maleïnsäure, 4 Di-Ammoniumalkyl-Estersalze der Phthalsäure und 4 Di-Ammoniumalkyl-Estersalze der Camphersäure wurden auf Curarewirkung untersucht.

„Head-drop"-Dosis, Latenzzeit und Dauer der Curarewirkung bei Kaninchen sowie mittlere wirksame Dosis und Latenzzeit bis zum Eintritt einer totalen Lähmung des Bewegungsapparates bei Mäusen („inclined screen"-Methode) wurden verglichen und Beziehungen zu Variationen im Molekül untersucht.

Von der Bernsteinsäure-Serie abgesehen, verursachte der Austausch von Methylsubstituenten am Stickstoff mit Äthyl eine Erniedrigung der wirksamen Dosis und eine verlängerte Wirkung. Die stark verzweigte Camphersäure rief eine ausgeprägte Verlängerung der Wirkungsdauer hervor.

Literatur

Bovet, D., e F. Bovet-Nitti: Rendiconti Ist. Sup. Sanità **12**, Parte I—III. Numero speziale sui curari di sintesi (1949). — Bovet, D., F. Bovet-Nitti, S. Guarino, V. G. Longo e M. Marotta: Rendiconti Ist. Sup. Sanità **12**, 106 (1949). — Christiansen, J., R. G. Hansen and J. Fakstorp: Acta chem. scand. (Copenh.) **7**, 128 (1953). — Kärber, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **162**, 480 (1932). — Rosnati, V., e D. Bovet: Rendiconti Ist. Sup. Sanità **14**, 473 (1951). — Thesleff, S., and K. R. Unna: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **111**, 99 (1954). — Varney, R. F., C. R. Linegar and H. A. Holaday: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **97**, 72. (1949).

Marianne Schilling, Forschungsabteilung d. A/S PHARMACIA, Kopenhagen V, Skt. Knuds Vej 16

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 377—386 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Amerikanischen Universität
Beirut/Libanon (Direktor: Prof. Dr. George Fawaz)
und dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. Fritz Eichholtz)

Die Wirkung von Fluoressigsäure auf Leistung und Stoffwechsel des Herzlungenpräparates des Hundes*

Von
George Fawaz

(Eingegangen am 14. Januar 1956)

Einleitung

Die Fluoressigsäure (FES) wurde erstmalig 1896 von Swarts[27] synthetisch dargestellt, aber erst seit dem zweiten Weltkrieg ist sie Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. In den USA ist die FES als „Compound 1080" bekannt. Trotz ihrer ausgezeichneten Eigenschaften als Rattenvertilgungsmittel ist ihre praktische Anwendbarkeit — infolge ihrer großen Toxicität für Mensch und Tier — begrenzt.

Viele Derivate und Analoge der FES wurden synthetisiert und auf biologische Wirksamkeit geprüft. Es hat sich dabei herausgestellt, daß die toxische Wirkung

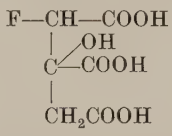
an das Vorhandensein einer bestimmten Gruppierung (F—CH_2—C—) gebunden ist. F—CH_2—CH_2—Cl z. B. ist nicht toxisch, weil es im Organismus nicht in die entsprechende Ketoverbindung umgewandelt werden kann. Von den Homologen der FES sind nur diejenigen mit gerader C-Atomzahl wirksam[26]. Diese Tatsache ist so zu erklären, daß nur diese Homologen durch Knoopsche β-Oxydation in FES abgebaut werden. In der Tat erwiesen sich von allen untersuchten Fluorverbindungen die FES und deren Methylester am wirksamsten. Marais gelang es 1944, die FES aus einer südafrikanischen Pflanze Dichapelatum cymosum zu isolieren. Diese Pflanze ist für das Vieh äußerst gefährlich: 20 g frische junge Blätter stellen für ein Schaf die tödliche Dosis dar. Die FES ist damit die erste und bisher einzige in der Natur vorkommende organische Fluor-Verbindung.

Sowohl Biochemiker als auch Pharmakologen haben sich mit dem Mechanismus der FES-Wirkung beschäftigt. Bartlett und Barron[1] haben die Wirkung der FES auf beinahe alle bekannten isolierten Fermentsysteme geprüft mit völlig negativen Ergebnissen. Dieselben Autoren stellten jedoch fest, daß die FES die Atmung von Gewebeschnitten (Warburg) hemmt. Die Tatsache, daß die FES die Atmung von Meerschweinchen-Hirnschnitten um 53%, die Atmung von Kaninchen-Hirnschnitten aber nur um 13% hemmt, legte die Vermutung nahe, daß die FES die Oxydation von Acetat blockiert, da bekanntlich Kaninchenhirn im Gegensatz zu Meerschweinchenhirn Acetat beinahe gar nicht zu oxydieren vermag. In der Tat erwies sich der Zusatz von FES als stark hemmend für den oxydativen Abbau von

* Die Arbeit wurde mit Unterstützung der American Heart Association durchgeführt.

Acetat durch Herz- (90%), Leber- (59%) und Nieren- (62%) Schnitte. Voraussetzung für die hemmende Wirkung ist, daß die FES dem Medium etwa 15 min vor der Zugabe des Acetats zugesetzt werden muß, eine Tatsache, auf die ich unten im Zusammenhang mit meinen Versuchsergebnissen eingehen werde. Auf Grund dieser und anderer Beobachtungen schlossen Bartlett und Barron, daß FES die Oxydation der Essigsäure nach dem Mechanismus einer „competitive inhibition" unterbindet.

Liebecq und Peters[14] verwendeten Homogenate von Meerschweinchennieren, denen 0,05 mM FES zugesetzt worden war. Die Oxydation von Fumarsäure durch die Homogenate führte zu einer Anhäufung von Citronensäure. Dieser neue Befund erforderte eine neue Hypothese; denn hier lag offensichtlich eine Unterbindung des Citronensäurecyclus vor, obgleich keines der einzelnen Fermente dieses Cyclus durch FES zu beeinflussen war. Es ergab sich so die Vermutung, daß die FES in eine andere Verbindung übergeht, welche die wahre hemmende Wirkung entfaltet. Diese Ansicht wurde gleichzeitig unabhängig auch von Martius[17] geäußert. Diese in vitro erzielten Ergebnisse wurden durch zahlreiche Untersuchungen an intakten Tieren von Peters[2, 3] und auch von Potter[23, 24] bestätigt. Es hat sich z. B. gezeigt, daß letale Dosen von FES den Citronensäuregehalt einiger Organe bis aufs 80fache der Norm erhöhen können. Peters[20] meint, daß diese Anhäufung von Citronensäure in FES-vergifteten Tieren der beste Beweis dafür ist, daß der Citronensäurecyclus tatsächlich auch in vivo vor sich geht. Den endgültigen Beweis dafür, daß die FES in eine neue wirksame Fluorverbindung umgewandelt wird, erbrachten Peters u. Mitarb.[19, 12] durch die Isolierung der Fluorcitronensäure,



Diese Verbindung ist neuerdings auch von Rivett[25] synthetisiert worden. Das synthetische Produkt besitzt 50% der Wirksamkeit des Naturkörpers, obwohl die Fluorcitronensäure 4 Isomeren besitzen muß. Offenbar ist nur ein asymmetrisches C-Atom für die enzymatische Wirkung von Belang. Weitere Versuche von Lotspeich und Peters[15] ergaben, daß die Fluorcitronensäure eine „kompetitiv-hemmende" Wirkung auf die Aconitase ausübt; dieses Ferment vermittelt bekanntlich den Übergang von Citronensäure in cis-Aconitsäure. Trotz dieser Befunde ist jedoch die Frage noch unentschieden, ob die Toxicität der FES tatsächlich allein auf dieser Hemmung der Aconitase — infolge Bildung von Fluorcitronensäure — beruht.

Die Hauptangriffspunkte der FES im Organismus sind das Zentralnervensystem und das Herz. Je nach der Tierart erfolgt der Tod a) infolge Atemstillstands nach schweren Krampfanfällen, b) infolge zunehmender Herzinsuffizienz eventuell Kammerflimmern, c) wegen progressiver Depression des Zentralnervensystems mit Atem- bzw. Kreislauf-Insuffizienz als unmittelbarer Todesursache.[4] Die letale Dosis ist auch von der Tierart abhängig: Für den Hund ist die LD 50 0,06 mg/kg, wobei der Tod auf zentralen Wirkungen beruht; eigene Versuche ergaben, daß eine solche Dosis auf das Herz völlig wirkungslos ist. Für die Albino-Ratte ist die LD 50 5 mg/kg, für die südafrikanische Kröte sogar 500 mg/kg.

Verständlicherweise hat man versucht, die toxische Wirkung durch Verabreichung verschiedener Metaboliten des Citronensäurecyclus zu unterdrücken, aber ohne Erfolg. Bescheidene therapeutische Wirkungen wurden bisher nur durch prophylaktische Gaben von Acetat und Äthanol[28, 12] sowie insbesondere von Glycerinmonoacetat[5] erzielt. Es wäre in diesem Zusammenhang von Interesse, auch Propanol und Propionat in diese therapeutischen Versuche einzubeziehen. Die

Begründung ergibt sich aus folgenden Beobachtungen: Bei Verabreichung von C_4-Teilstücken des Citronensäurecyclus (wie Bernsteinsäure) kommt es nach eigenen Versuchen[6] an FES-vergifteten Ratten zu einer weiteren Zunahme der angehäuften Citronensäure, während die C_2-Teilstücke (wie Acetat) durch Konkurrenz mit FES eine Abnahme der Citronensäure verursachen. Injiziert man verschiedene Metaboliten FES-vergifteten Ratten, so läßt sich durch Bestimmung der Citronensäure prüfen, ob sie intermediär in C_2- oder C_4-Teilstücke des Cyclus umgewandelt werden. Im Verlauf dieser Studien ergab sich, daß Propanol und Propionat in richtiger Dosierung die Citronensäure-Anhäufung im Herzen und in der Niere FES-vergifteter Tiere völlig verhindern können. Die therapeutischen Konsequenzen dieser Befunde werden zur Zeit weiter untersucht. Ein besonders interessantes Problem ergab sich bei Prüfung der Buttersäure: Man würde erwarten, daß sie nach der Lehre der β-Oxydation, ähnlich der Essigsäure, die Citronensäure-Anhäufung vermindern würde. Es war jedoch das Gegenteil der Fall: Die Buttersäure verhielt sich wie die C_4-„Teilstücke" des Cyclus (Bernsteinsäure, Fumarsäure, α-Ketoglutarsäure und Weinsäure). Möglicherweise wird also die Buttersäure — zumindest im Herzen — durch Omega-Oxydation in Bernsteinsäure übergeführt.

Problemstellung

Die vorliegende Arbeit galt

a) dem näheren Studium der FES-Wirkung auf das Herz des Hundes im Herzlungenpräparat (HLP),

b) der weiteren Aufklärung des Mechanismus der FES-Vergiftung. Sowohl die Barbiturat- als auch die Chinidin-Insuffizienz des Herzens sind durch dreierlei charakterisiert:

1. Die Insuffizienz tritt sofort ein und ist um so stärker, je größer die Dosis gewählt wird.

2. Beide Arten von Insuffizienz werden durch Digitaliskörper und Digitaloide weitgehend korrigiert, ähnlich wie die Spontaninsuffizienz des HLP[13, 8].

3. Die Barbiturat-, Chinidin- und Spontan-Insuffizienz gehen nicht mit einer Verminderung der sogenannten „energiereichen" P-Verbindungen wie Kreatinphosphorsäure (KP) und Adenosintriphosphorsäure (ATP) einher. Bei der spontanen Insuffizienz nehmen die Werte für energiereiche Phosphate sogar eher zu[29, 7]. Man vermutet daher bei der Barbiturat-Insuffizienz nicht einen Mangel an Produktion von energiereichen Phosphorverbindungen, sondern vielmehr eine Behinderung der Utilisation dieser Verbindungen, soweit sie überhaupt für die Herzmuskelkontraktion direkt oder indirekt als Energiequelle dienen.

Dagegen wäre bei einer Insuffizienz durch FES, welche den Citronensäurecyclus hemmt, von vornherein mit einer Verminderung der ATP-Werte im Herzmuskel zu rechnen; denn ATP wird bekanntlich durch die Umsetzungen des Citronensäurecyclus regeneriert, wobei mit jedem Durchlaufen des Cyclus, d. h. mit jeder Verbrennung eines C_2-(acetyl)-Fragments 15 energiereiche P-Bindungen entstehen. (ATP enthält zwei solche energiereiche Bindungen, die durch leichte Hydrolysierbarkeit

ausgezeichnet sind; dieser Anteil des ATP-Phosphors wird daher als „labiler" Nucleotid-Phosphor bezeichnet.) Das Herz eignet sich besonders für unsere Fragestellung, denn es ist auf den aeroben Stoffwechsel angewiesen und reichlich mit Fermenten des Citronensäurecyclus versorgt. In den folgenden Versuchen wurde eine Dosis von FES gewählt, welche ohne große Verzögerung — etwa innerhalb einer Stunde — eine Herzinsuffizienz erzeugen kann; eine Insuffizienz, die erst nach mehreren Stunden zur Ausbildung käme, wäre schwer von einer spontanen Insuffizienz zu unterscheiden.

Um die Zusammenhänge zwischen Citronensäure-Anhäufung, Herzinsuffizienz und Änderung der energiereichen Phosphorverbindungen im Herzen zu ermitteln, wurden neben dem Gehalt an Kreatinphosphat und labilem Adenosin-P auch der Gehalt an Citronensäure im Herzmuskel verfolgt. Gerade die Citronensäure-Anhäufung muß als verläßlichstes Kriterium der spezifisch metabolischen Wirkung der FES angesehen werden.

Methoden

Das Herzlungenpräparat. Sämtliche Versuche wurden an erwachsenen Hunden beiderlei Geschlechts ausgeführt. Die HLP nach Starling wurden wie üblich unter Pentobarbitalanästhesie durchgeführt. Die „Donator"-Hunde wurden mit Chloroform narkotisiert. Die Lungen wurden mit O_2 beatmet. Außerdem wurde das venöse Blutreservoir durch ein gefrittetes Glasröhrchen unter Anwendung eines antischäumenden Mittels — Dow-Corning-Antifoam A — mit O_2 durchperlt. Dieses letzte Verfahren genügt allein — also ohne Lunge — um das Blut zu arterialisieren. Blutdruck und Venendruck — im rechten Vorhof — wurden fortlaufend bestimmt. Der „Systemic output" (= Minutenvolumen minus Coronardurchblutung), der Puls und das EKG in Ableitung I oder II, wurden alle 5 min registriert. Das Blutniveau im Reservoir war immer 10 cm höher als die Mündung der Vena cava inferior. Die venöse Kanüle hatte einen inneren Durchmesser von 0,6 cm. Die Resistenz war auf 6,8 cm Hg angesetzt. Der Blutdruck variierte zwischen 100 und 125 mm Hg. Das Gesamtblut betrug etwa 900 cm^3, die Temperatur 38°—38,5° C. Die FES wurde in einmaliger Dosis dem Reservoir zugesetzt.

Bestimmung der Phosphorverbindungen. Die chemische Aufarbeitung der Muskulatur erfolgte entsprechend den — schon früher von uns beschriebenen — Bedingungen[7]. Die wesentlichen Schritte sind dabei folgende: Ein Stück vom linken Ventrikel nahe der Herzspitze (etwa 2 g Frischgewicht) wurde schnell mit einem Rasiermesser abgeschnitten und in ein CO_2-Äthergemisch (— 65° C) getaucht. Flüssige Luft gibt unwesentlich höhere KP-Werte. Sollte die Herzprobe (was nach Möglichkeit vermieden wurde) mehr als 3 g wiegen, so sinkt der KP-Wert unter Vermehrung des Wertes für anorganischen Phosphor beim Einfrieren ab, während der ATP-Wert unverändert bleibt. Die gefrorene Muskelprobe wurde mit Filterpapier getrocknet und schnell in einem Wägegläschen gewogen. Sie wird sodann mit CO_2 und Glaspulver in einem gekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben und quantitativ in einen Erlenmeyerkolben mit der berechneten Menge 5% Trichloressigsäure übertragen. Die Neutralisation des eingekühlten Trichloressigsäurefiltrats geschieht 10 min nach der Behandlung mit Trichloressigsäure. Anorganisches Phosphat und KP wurden nach Fiske und Subbarow[10] bestimmt. Der labile Nucleoditphosphor — also etwa $^2/_3$ des ATP-Phosphors — wurde durch 7 min dauernde

Hydrolyse in n-HCl bei 100° C bestimmt unter Abziehung der Werte für anorganisches P und KP. Experimente an kristallisiertem — 100%ig reinem — ATP ergaben, daß 7 min genügen; 10 min Hydrolyse ergibt etwa um 8% höhere Werte. Daß der 7-Minutenwert tatsächlich dem labilen Nucleotidphosphor entspricht, wurde durch papierchromatographische Bestimmungen bestätigt. Dabei wurden am Papierstreifen nach der Elution eine Adeninbestimmung sowie eine Phosphorbestimmung durchgeführt. Alle Phosphorwerte sind als mg P/100 g frisches Gewebe und auch als Prozent des säurelöslichen Gesamt-Phosphors ausgedrückt. Da bei Herzlungenpräparaten gelegentlich Ödeme verschiedenen Grades eintreten, wurde in jedem Falle eine Trockengewichtsbestimmung gemacht. Alle Werte wurden auf ein Trockengewicht von 23% bezogen. Dieser Wert ist das mittlere Trockengewicht aus einer großen Serie von intakten Hundeherzen.

Citronensäurebestimmung: Die Analysen erfolgten sowohl im Serum als auch im Herzen nach einer modifizierten Pentabromaceton-Methode[18, 6].

Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Als Ausdruck für die Herzinsuffizienz ist die Abnahme des „Systemic output" zu betrachten. Der Venendruck, der ja sonst ein empfindlicheres Zeichen der Insuffizienz ist, zeigte Schwankungen und stieg nicht immer parallel mit der Abnahme des „Systemic output" an. Der Blutdruck ändert sich in der Regel nicht. Nur gegen Ende des Experiments waren in den meisten Fällen mit hohen FES-Dosen Schwankungen zu sehen, welche auf einem ventrikulären Eigenrhythmus beruhen. In drei Fällen folgte anschließend ein Kammerflimmern. Das EKG zeigte keine Abnormitäten, außer den erwähnten Rhythmus-Anomalien: Zeichen von Hypocalcämie waren nicht vorhanden. Die Herzfrequenz nahm im Laufe der Versuchszeit praktisch in jedem Falle ab. Im Gegensatz dazu stieg die Frequenz bei den unvergifteten Herzen regelmäßig an. Aus den in der Tabelle wiedergegebenen Daten sind folgende weitere Schlüsse zu ziehen:

a) Die Insuffizienz nach FES tritt nicht sofort ein, wie bei der Barbiturat- bzw. Chinidin-Insuffizienz. Es gibt zunächst — unabhängig von der Dosis — eine Latenzperiode von etwa 10—30 min, wonach die Insuffizienz um so schneller fortschreitet, je größer die FES-Dosis ist.

b) Mit 20 mg FES ist bereits die maximale Wirkung erreicht; die Ergebnisse mit 20 und 50 mg FES unterscheiden sich daher sehr wenig. Immerhin ist das Herz des Hundes relativ resistent gegen FES, wenn man bedenkt, daß die LD 50 fürs ganze Tier nur 0,06 mg/kg beträgt.

c) Der Citronensäuregehalt des Herzmuskels steigt bis aufs 20fache der Norm an. Keine Spur davon geht ins Blut über. Die Herzzellen sind also für Citronensäure nicht durchgängig. Die Größe der Citronensäure-Anhäufung ist von der FES-Dosis abhängig.

d) Am wichtigsten für unsere Problemstellung sind die Veränderungen der sogenannten „energiereichen" Phosphorverbindungen, d. h. Kreatinphosphat und Adenosintriphosphat. Aus der Tabelle geht klar hervor, daß parallel mit der Anhäufung der Citronensäure eine

Tabelle 1

Protokoll Nr.	Fluoressigsäure mg/Tier	Versuchsdauer in min seit Zugabe der FES	Zeit nach Zugabe der FES (in min) "Systemic Output" in cm³/5 sec							Ende des Experiments	Herz-Frequenz		Citronensäure im Serum (Mikrogr. pro cm³)	
			0	10	20	30	40	50	60		Anfang	Ende	Anfang	Ende
			Kontrollversuche											
1	—	120	90	82	87	82	85	83	88	83	132	136	24	20
2	—	120	65	64	64	64	63	63	60	9	140	136	19	18
3	—	60	92	85	89	85	85	85	84	84	132	140	22	26
4	—	60	80	80	77	77	73	73	74	74	160	180	18	15
5	—	60	83	80	75	75	75	73	75	75	140	144	18	18
6	—	60	80	78	81	76	76	72	74	74	140	156	24	24
			Fluoressigsäureversuche											Mittelwerte
1	2,2	120	82	85	83	84	83	78	79	67	140	148	12	17
2	10	120	61	54	43	42	39	35	31	23	148	120	24	29
3	10	120	99	95	95	69	70	58	55	30	192	100	24	27
4	10	120	92	97	86	80	70	65	58	23	148	116	39	36
5	10	120	87	86	86	81	76	75	73	57	184	156	19	18
														Mittelwerte
6	15	93	89	79	67	42	28	20	15	7	200	72	28	24
7	15	90	73	72	72	62	50	40	26	10	144	92	19	24
8	15	73	85	90	89	84	70	46	25	23	172	104	20	27
9	15	90	90	68	69	68	66	53	37	8	168	128	17	4
10	15	90	70	66	55	46	42	37	32	37	132	144	19	31
11	15	90	66	62	63	55	48	44	30	12	144	124	15	28
														Mittelwerte
12	20	60	83	83	78	67	51	33	23	23	188	132	17	21
13	20	60	100	99	92	84	44	27	15	15	168	92	29	35
14	20	60	94	89	88	56	20	13	7	7	148	124	36	39
15	20	60	76	60	50	22	21	22	14	14	144	56	35	26
														Mittelwerte
16	50	60	83	80	78	76	60	32	21	21	180	104	22	27
17	50	60	90	101	90	54	19	12	18	18	164	48	21	25
18	50	60	75	73	65	60	44	35	35	35	136	96	20	20
19	50	60	66	60	51	23	13	11	8	8	124	80	13	17
20	50	60	57	45	30	20	13	6	4	4	120	96	12	9
21	50	56	70	62	55	52	46	28	27	27	156	124	26	32
22	50	60	68	72	60	54	29	28	22	22	128	48	13	19
23	50	60	72	75	55	27	17	13	8	8	132	82	17	27

Tabelle 1

Herzzitronensäure (Mikrogr. pro g)	Kreatinphosphat mgP/100 g	Kreatinphosphat % des Gesamt-P	Anorgan. Phosphat mgP/100 g	Anorgan. Phosphat % des Gesamt-P	„Labil." Nucleotid-P $^2/_3$ des ATP—P mgP/100 g	„Labil." Nucleotid-P $^2/_3$ des ATP—P % des Gesamt-P	Unbestimmt. P mgP/100 g	Unbestimmt. P % des Gesamt-P	Gesamt-P mgP/100 g	Bemerkungen
44	16,4		12,8		27,1				88,9	
57	27,1		13,8		32,2				102,7	Lungen hämorrhag. m. Ödem. O_2 nicht durchgeleitet
61	17,8		17,6		32,9				98,7	
26	27,6		16,0		33,0				107,0	
59	24,7		16,5		32,4				106,0	
65	7,4		28,4		31,0				102,2	Herzprobe 7,1 g KP u. AP nicht berücksichtigt
	22,7		15,3		31,4		15,6		100,7	
95	18,0		14,4		30,4				101,0	
454	16,7		17,3		33,2				100,7	
345	10,9		14,3		24,5				81,1	
414	20,9		15,9		30,3				100,0	
318	15,9		16,4		33,2				109,8	
	16,1	16,4	15,9	16,3	30,3	30,9	20,5	20,8	98,0	
826	4,4		23,3		28,0				88,8	Kammerflimmern
588	5,6		17,3		23,2				78,7	
867	5,0		21,8		22,8				75,9	Kammerflimmern
666	12,6		16,9		30,5				88,2	
616	18,6		20,2		30,9				103,3	
677	9,8		16,4		32,0				88,6	
	9,3	10,6	19,3	22,1	27,9	32,0	16,7	19,1	87,2	
951	4,0		21,0		30,2				89,9	
611	7,5		16,7		21,8				70,5	
904	5,2		19,0		15,9				65,9	
927	4,0		23,2		18,1				68,9	
	5,2	7,0	19,9	26,8	21,5	29,0	16,7	22,6	74,0	
1150	4,1		18,1		20,4				74,9	
1050	1,8		16,3		16,9				59,1	
919	5,4		20,0		27,3				85,5	
1100	2,7		21,5		19,2				75,9	Herzprobe 6,6 g KP u. AP nicht berücksichtigt
1092	4,9		17,4		23,9				80,6	
863	3,5		27,0		27,3				95,6	Kammerflimmern
920	7,1		20,0		23,5				79,1	
960	3,4		22,8		19,0				75,5	
	4,3	5,5	20,2	25,6	22,2	28,3	20,5	26,2	78,3	

Verminderung der KP-Werte eintritt. Diese Abnahme ist auch deutlich, wenn man die KP-Werte als Prozent des säurelöslichen Gesamt-Phosphors ausdrückt. Die Zahl der Kontrollversuche ist weit größer, als dies der Tabelle zu entnehmen ist. So ergaben sich z. B. in eigenen, schon früher publizierten[7] Versuchsreihen folgende Zahlen für das Kreatinphosphat der Ventrikelmuskulatur:

7 Normale HLP 19,5 (± 1,47) mg P/100 g,
9 Barbiturat-insuffiziente HLP 23,5 (± 1,58) mg P/100 g,
19 Intakte Hunde 18,2 (± 0,88) mg P/100 g,
18 Intakte Hunde 19,9 (± 0,84) mg P/100 g (Herzprobe in flüssiger Luft gefroren).

Auch für ATP stimmen die in der Tabelle gegebenen Kontrollversuche mit über 50 an HLP und intakten Hunden ausgeführten Kontrollversuchen gut überein. Daß die Erniedrigung der KP-Werte nicht etwa auf Hypoxie des Herzmuskels beruht, haben wir in zwei Experimenten (Protokoll-Nr. 22 u. 23) durch Bestimmung des O_2-Gehaltes des Coronarvenenblutes nach Van Slyke bewiesen. Die Werte vor der Zugabe der FES waren jeweils 4,3 und 5,2 vol.-% O_2; kurz vor Beendigung des Versuches stiegen die Werte auf 20,6 bzw. 14,4. Künstlich erzeugte Hypoxie (Beatmung mit O_2-armer Luft oder Abbindung der Coronararterien) führt stets zu einer Abnahme der KP-Werte[9].

Der Versuch, die Abnahme des Kreatinphosphats mit dem Grad der Insuffizienz in Beziehung zu bringen, führt nicht immer zu einem eindrucksvollen Bild; besser ist dagegen die Übereinstimmung zwischen der Abnahme der KP-Werte und der Anhäufung von Citronensäure. Bei der leider geringen Zahl der Experimente mit 10 mg FES ist z. B. nach 2 Std die Insuffizienz bedeutend, während die KP-Abnahme noch relativ klein ist. Auch bei den Versuchen mit 15 mg ist meist nach 90 min ein Absinken der KP-Werte auf nur 50% zu finden, obwohl dabei die Insuffizienz beinahe schon den höchsten Grad erreicht. Erst bei den höheren FES-Dosen sanken die KP-Werte bis auf 20% des Normalwertes ab. Ein gewisser Zusammenhang zwischen KP-Verminderung und Insuffizienz ist also offenbar vorhanden, streng quantitative Beziehungen zwischen beiden Phänomenen bestehen aber anscheinend nicht. Im Gegensatz dazu besteht gar kein Anlaß, eine unmittelbare Beziehung zwischen Herzinsuffizienz und Adenosintriphosphorsäure anzunehmen; denn bei den Versuchen mit 10 und 15 mg FES ist die Insuffizienz weder von einer absoluten, noch von einer relativen Abnahme von ATP begleitet; erst bei den höheren FES-Dosen sinken die absoluten ATP-Werte deutlich ab (etwa auf 67% des Normalwertes). Berechnet man jedoch die ATP-Werte als Prozent des säurelöslichen Gesamt-Phosphors, so ist die ATP-Abnahme selbst bei diesen höheren FES-Dosen unwesentlich.

e) Von Interesse ist, daß der säurelösliche Gesamtphosphor (GSLP) in Abhängigkeit von der FES-Dosis abnimmt. Einem derartigen Befund sind wir bisher beim Studium der verschiedenen Typen der Insuffizienz noch nicht begegnet. Vielleicht wandelt sich ein Teil der GSLP in säureunlöslichen Phosphor um. Eine andere Möglichkeit wäre, daß der beim Zerfall von KP anfallende anorganische P teilweise aus dem Myokard austritt.

Zusammenfassung und Diskussion

Aus den Versuchsergebnissen geht hervor, daß die FES eine Herzinsuffizienz im HLP auszulösen vermag, deren Schwere von der Dosis der FES abhängt. Die Ergebnisse lassen weiterhin den Schluß zu, daß die FES eine von der Dosis abhängige Unterbrechung des Citronensäurecyclus — gemessen an der Anhäufung der Citronensäure — verursacht. Dagegen wird durch die vorliegenden Experimente noch nicht entschieden, ob die Hemmung des Citronensäurecyclus mit der Herzinsuffizienz tatsächlich kausal zusammenhängt. Eine Möglichkeit, diese Frage zu beantworten, besteht darin, Substanzen wie Propanol oder Propionat gleichzeitig mit der FES zu verabreichen und zu sehen, ob mit der Unterbindung der Citronensäure-Anhäufung auch eine Verhinderung der Herzinsuffizienz bzw. der KP-Abnahme verbunden ist.

Gleichzeitig mit der Insuffizienz und mit der Anhäufung der Citronensäure kommt es in den FES-vergifteten Herzen zu einer Abnahme der KP-Werte. Es ist anzunehmen, daß die Insuffizienz wenigstens zum Teil durch das Sinken des KP-Gehaltes bedingt ist. Dies entspricht unseren Erfahrungen bei der Insuffizienz infolge Anoxie[9]. Dort wie hier ist eine Abnahme des KP-Gehaltes — nicht jedoch ein Schwund von ATP — für den Grad der Insuffizienz ausschlaggebend. Die ATP-Werte sinken nur dann etwas ab, wenn die Gewinnung der Herzmuskelprobe erst nach dem völligen Stillstand des insuffizienten Herzen erfolgt. Diese Ergebnisse sind mit den bis vor kurzem herrschenden Theorien der Muskelkontraktion nicht vereinbar; denn diese Theorien sahen im ATP die für die Lieferung der Kontraktionsenergie direkt verantwortliche Substanz. KP hätte dann nur die untergeordnete Aufgabe, das bei der Kontraktion zerfallende ATP immer wieder aufzubauen. Mit diesen Vorstellungen ist jedoch nicht in Einklang zu bringen, daß die Kontraktilität des Herzmuskels nach unseren Ergebnissen schon beim Absinken der KP-Werte schwer beeinträchtigt wird, d. h. zu einem Zeitpunkt, an welchem die ATP-Werte noch völlig normal sind. Neuerdings haben auch Experimente von Fleckenstein[11] an quergestreiften Froschmuskeln zu schwerwiegenden Argumenten gegen die Theorie einer direkten Gewinnung der Kontraktionsenergie aus der Spaltung von ATP geführt.

Die Frage liegt nahe, ob nicht die Herzinsuffizienz durch FES unter Umständen infolge einer vermehrten Bindung von Ca^{++} durch die

angehäufte Citronensäure zustande kommen könnte. Gegen diese Vermutung spricht jedoch, daß das EKG keine Zeichen von Hypocalcämie erkennen läßt. In Übereinstimmung damit können die toxischen Wirkungen der FES an sonst intakten Tieren durch Injektion von Calcium[22] nicht behoben werden.

Literatur

[1] Bartlett, G. R., and E. S. G. Barron: J. of Biol. Chem. **170**, 67 (1947). — [2] Buffa, P., and R. A. Peters: Nature (Lond.) **163**, 914 (1949). — [3] Buffa, P., and R. A. Peters: J. Physiol. **110**, 488 (1949). — [4] Chenoweth, M. B.: Pharmacol. Rev. **1**, 383 (1949). — [5] Chenoweth, M. B., A. Kandel, L. B. Johnson and D. R. Bennett: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **102**, 31 (1951). — [6] Fawaz, G., and Fawaz E. N.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **84**, 680 (1953). — [7] Fawaz, G., and E. S. Hawa: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **84**, 277 (1953). — [8] Fawaz, G.: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **88**, 654 (1955). — [9] Fawaz, G.: (unpubliziert). — [10] Fiske, C. H., and Y. Subbarow: J. of Biol. Chem. **81**, 629 (1929). — [11] Fleckenstein, A.: Der Kalium-Natrium-Austausch Berlin: Springer-Verlag 1955. — [12] Hutchens, J. O., H. Wagner, B. Podolsky and T. M. McMahon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **95**, 62 (1949). — [13] Krayer, O.: Archiv Exper. Path. u. Pharm. **162**, 1 (1931). — [14] Liebecq, C., and R. A. Peters: Biochim. et Biophysica Acta **3**, 215(1949). — [15] Lotspeich, W. D., R. A. Peters and T. H. Wilson: Biochemic J. **51**, 20 (1952). — [16] Marais, J. S. C.: J. Vet. Sci. Anim. Ind. **20**, 67 (1944). — [17] Martius, C.: Liebigs Ann. **561**, 227 (1949). — [18] Natelson, S., J. B. Pincus and J. K. Lugovoy: J. of Biol. Chem. **175**, 745 (1948). — [19] Peters, R. A.: Proc. Roy. Soc. B **139**, 143 (1952). — Endeavour **13**, 147 (1954). — [20] Peters, R. A.: Brit. Med. Bull. **9**, 116 (1953). — [21] Peters, R. A., R. W. Wakelin, P. Buffa and L. C. Thomas: Proc. Roy. Soc. B. **140**, 497 (1953). — [22] Peters, R. A., R. W. Wakeling and A. B. Hastings: Proc. Internat. Physiol. Congress Montreal **1953**, 674. — [23] Potter, V. R., and H. Busch: Cancer Res. 10, 353 (1950). — [24] Potter, V. R., H. Busch and J. Bothwell: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **76**, 38 (1951). — [25] Rivett, D. E. A.: J. Chem. Soc. (Lond.) **1953**, 3710. — [26] Saunders, B. C.: Nature (Lond.) **160**, 179 (1947). — [27] Swarts, F.: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **I**, Serie 3, **15**, 1134 (1896). — [28] Tourtellote, W. M., and J. M. Coon: Federat. Proc. **8**, 339 (1949). — [29] Wollenberger, A.: Amer. J. Physiol. **150**, 733 (1947).

Professor Dr. George Fawaz,
Pharmakol. Institut d. Amerik. Univ. Beirut (Libanon)

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 387—402 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. Fritz Eichholtz)

Messung zentralanalgetischer Wirkungen mit der Régnierschen Methode

Von
Rudolf Hotovy

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Dezember 1955)

Zur Messung starker analgetischer Effekte im Tierexperiment steht eine Reihe Methoden zur Verfügung, die letzthin in einigen Übersichtsreferaten dargestellt wurden (Wirth; Fleisch; Hardy, Wolff und Goodell u. a.). Das Auftreten einer leichten Analgesie hingegen war bisher experimentell schwierig zu erfassen, obwohl sich Arzneistoffe wie Aspirin, Phenacetin, Pyramidon usw. therapeutisch bewährt haben. Diese Lücke wurde nun ausgefüllt durch die nachfolgende Methode, die darauf beruht, daß sich nicht nur Opiate — wie seit langem bekannt —, sondern auch schwächere Analgetica, kombiniert mit lokalanaesthetischen Stoffen, wirkungsmäßig potenzieren.

Den Synergismus von zentral- und lokalanalgetisch wirksamen Pharmaka an der Kaninchencornea haben Stender u. Amsler zum *ersten Male* beschrieben. Sie konnten durch i.v. Zufuhr von Morphin und Pantopon die lokalanaesthetische Wirkung von Cocain und anderen Lokalanaesthetica auf die Cornea verstärken und verlängern. Die Befunde wurden von Weiss, Keil und Hepp sowie Keil u. Pöhls mit Hilfe der Régnierschen Methode *bestätigt.*

Die Brauchbarkeit unseres Testes für die Messung analgetischer Wirkungen sei im folgenden an Versuchsbeispielen gezeigt, die auf die mannigfachen Anwendungen dieser Methode hinweisen sollen.

Methodik

Es wurde entweder nach dem Vorgehen von Keil u. Pöhls die minimale zentralanalgetische Dosis (Summationsreize 100 = 100%ige Analgesie z. B. für 2—4 min) oder nach dem Vorgehen von Weiss die für eine einheitliche Dauer der Wirkung (z. B. 15 min) benötigten Präparatdosen bestimmt. Verwendet wurden Kaninchen im Gewicht von 2—4 kg, die sich durch ruhiges Wesen auszeichneten. Besonders die Rasse Chinchilla, ferner weiße und schwarze Wiener Kaninchen erwiesen sich als geeignet. Dagegen waren Kaninchen vom Felltyp der Feldhasen sehr widerstandsfähig und träge in der Reaktion auf Pharmaka. Weibliche waren besser geeignet als männliche. Es empfiehlt sich durch Vorversuche die gleichmäßig reagierenden Tiere herauszufinden. Die Reaktion der Kaninchen ist temperaturabhängig: bei kalter Witterung reagieren sie träger als bei warmer. Daher empfiehlt

sich konstante Raumtemperatur (klimatisierte Räume). Zur Bestimmung der analgetischen Dosis und des quantitativen Nachweises eines Analgeticums genügt der Einsatz von 2—3 gleichmäßig reagierenden Kaninchen.

Zur Bestimmung der analgetischen Grenzdosis wurden bei den späteren Versuchen 5 Gruppen zu je 8 Kaninchen eingesetzt, die das gleiche Futter erhielten. Die Wimpern des rechten Auges wurden kurz abgeschnitten. Von Zeit zu Zeit wurde die Cornea mit Hilfe einer 1%igen Fluorescein-Natrium-Lösung auf Intaktheit geprüft. Die Versuchspausen betrugen mindestens 2—3 Tage. Mit einem weißen Kaninchenschnurrhaar, das rechtwinklig an einem Holzstäbchen befestigt war und bei 80—100 mg Belastung eine Durchbiegung erfuhr, wurde ein Reiz durch einen senkrecht auf die Mitte der rechten Cornea gezielten Schlag gesetzt (nach Strughold ist die Empfindlichkeit der Cornea in der Mitte am größten). Bis zur Erzielung einer 100%igen Anästhesie (= 100 Reizschläge) von 20—30 min Dauer wurden verschieden konzentrierte Lösungen von α-Butyl-oxycinchoninsäure-diäthyl-äthylen-diamid-chlorhydrat (Nupercain Wz.) unter Abheben der Lider in den Bindehautsack gebracht. Die Cornea muß hierbei für die Dauer von 2 min von dem Lösungsspiegel bedeckt sein. 3, 5, 10, 15, 20 min danach wird die Cornea durch Schläge mit dem Reizhaar getestet. Es erwies sich als vorteilhaft, jeweils dreimal kurz hintereinander die Summe der bis zum nächsten Lidschluß notwendigen Reizschläge festzustellen und daraus den Mittelwert zu errechnen. Die erforderliche Nupercainwirkungskonzentration betrug 0,001—0,0025%. Die Lösungen wurden täglich aus einer 0,5%igen Lösung hergestellt oder frisch angesetzt. Sobald die notwendigen Summationsreize auf 10—20 abgefallen waren, wurde das zu untersuchende Präparat in die Ohrvene injiziert und die Summationswerte wiederum nach 3, 5, 10, 15 min usw. bestimmt. Der Versuch galt als beendet, wenn zur Auslösung des Cornealreflexes nur noch eine Summe von 10—20 Reizen erforderlich war. Die Durchführung der angegebenen Analgesieprüfung erfordert eine gewisse Übung.

1. Vergleichende Untersuchungen über die zentralanalgetische Wirksamkeit mit Hilfe des Nupercaintestes

a) Narcotica: Die Verabreichung erfolgte in wässeriger Lösung i. v. mit Hilfe des Dauerinfusionsgerätes nach Hoffmann und Witte. Die benötigte Dosis wurde in 9 ml/kg Wasser oder 0,85%iger Kochsalzlösung gelöst und innerhalb von 30 min verabreicht.

Mit Paraldehyd in der Dosierung 0,5, 0,75 und 1 ml/kg ließ sich keine gleichmäßige Infusion durchführen, da die Emulsion mit Kochsalzlösung nicht beständig war. Bei den 4 Versuchskaninchen konnte ohne Nupercainbehandlung der Cornea keine zentrale Analgesie erzielt werden. Dagegen hatten Dosen von 0,5 und 0,75 ml/kg i.v. nach Vorbehandlung der Cornea mit Nupercainlösung (von 0,25%) bei den gleichen Versuchstieren einen 15 min lang anhaltenden zentralanalgetischen Effekt.

Äthylalkohol war bis zu 2,0 ml/kg i.v. nicht analgetisch wirksam, obwohl diese Dosierung zu Seitenlage führte. Nach Vorbehandlung mit Nupercain konnte mit 0,25 ml/kg Äthylalkohol eine 1 min dauernde und mit 0,5 ml/kg keine Analgesie erreicht werden. Äther pro narcosi (0,47 und 0,83 ml/kg i.v.) entfaltete bei den Infusionszeiten von 30, 20 und

10 min keine Empfindungslosigkeit nach Vorbehandlung mit Nupercain. Die Infusion des Natriumsalzes der Phenyläthylbarbitursäure (Luminalnatrium Wz.; 10—60 mg/kg i.v.) und des Natriumsalzes der N-Methyl-5,5-cyclohexenyl-(methyl)-barbitursäure (Evipan-Natrium Wz.; 10, 20 und 30 mg/kg i.v.) löste bei den mit Nupercain vorbehandelten Kaninchen keinen zentralanalgetischen Effekt aus. Höchste Dosen wirkten narkotisch (Seitenlage) ohne vorherige Analgesie. Demgegenüber ließ sich mit anderen Barbitursäurederivaten wie Cyclohexenyläthylbarbitursäure (Phanodorm Wz. als Natriumsalz; 10—50 mg/kg i.v.), Mononatriumsalz der Diäthylbarbitursäure (Veronal-Natrium Wz.; 10 bis 90 mg/kg i.v.), 5,5-Äthyl-(1-methyl-butyl)-thiobarbitursaures Natrium (Thiopentone-Natrium; 5—20 mg/kg i.v.) und 5,5-Äthyl-(isoamyl)-barbitursaures Natrium (Amytal-Natrium Wz.; 10—30 mg/kg i.v.), zwar — sofern sie allein gegeben wurden — keine Steigerung der Summationsreizzahl auf 100 und somit kein zentralanalgetischer Effekt erzielen,

Tabelle 1. *Dauer der zentralen Analgesie in Minuten bei einem Kaninchen (4,0 kg Körpergewicht) nach Vorbehandlung der Cornea mit 0,0025%iger Nupercain-Lösung*

Präparat	Dosis in mg/kg, infundiert in 30 min								
	5	10	15	20	25	30	40	60	80
Phanodorm-Natrium	∅	∅		∅		16	34	41	
Amytal-Natrium . .		21		86	98	Seitenl.			
Thiopenton-Natrium	∅	19	31	34 Seitenl.					
Veronal-Natrium . .	∅	∅	∅		∅	∅	8	35	45

Tabelle 2. *Übersicht über die Dosierung verschiedener Opiate, die bei 3 Kaninchen (Mittelwert 3—4 Versuche) zur Erzielung einer analgetischen Wirkung von gleicher Dauer nötig war*

Opiate	Dosis in mg/kg	Tier Nr. 1 Anaesth. in min	Tier Nr. 2 Anaesth. in min	Tier Nr. 3 Anaesth. in min
1. Morphin .	3,6	84	74	65
2. Laudanon .	4,0	86	78	72
3. Pantopon .	3,6	85	75	68
4. Narcophin .	4,0	82	77	70
5. Heroin . .	0,225	88	75	68
6. Dilaudid . .	0,15	86	75	70
7. Dicodid . .	2,0	83	73	65
8. Acedicon .	1,6	75	68	67
9. Eukodal .	1,5	84	73	65
10. Codein . .	18,0	71	73	61
11. Dionin . .	10,8	80	70	66
12. Papaverin .	10,8	82	73	69

Tabelle 3. *Vergleich der Wirkungsqualitäten von Opiaten bezogen auf Morphinum hydrochloricum gleich 100*

Opiate	Atemwirk. am Kaninchen i.v. Keil u. Pöhls	Analgesie am Kaninchen i.v. Keil u. Pöhls	Analgesie am Kaninchen i.v. Synergismus mit Nupercain Silvzis	Analgesie am Kaninchen s.c. Weiss	Schwänzchenphänomen n. Straub, Keil u. Kluge	Verstärkg. d. Cocainkrämpfe d. Ratten s.c. Eichholtz u. Krauth	Analgesie am Hund s.c. Koll	Analgesie am Menschen
1. Morphin	100	100	100	100	100	100	100	100
2. Laudanon	70	60	90	65	65	100	—	50
3. Pantopon	58	50	100	65	64	–	—	50
4. Narcophin	93	90	90	32	96	100	—	30
5. Heroin	1600	800	1600	280	234	800		200
6. Dilaudid	1600	1600	2400	500	300	800	780	500—1000
7. Dicodid	155	180	180	—	56	200	50	66
8. Acedicon	370	140	225	—	—	100	90	100
9. Eukodal	400	390	240	—	—	330	160	150
10. Codein	—	30	20	10	—	33	—	—
11. Dionin	—	—	33	—	—	25	—	—
12. Papaverin	—	—	33	—	—	—		

doch war bei den mit Nupercain vorbehandelten Tieren eine sehr eindrucksvolle Empfindungslosigkeit der Cornea nachweisbar. Die Zahlenwerte der Analgesiedauer bei einem mit 4 Barbitursäurederivaten behandelten Kaninchen lassen dies gut erkennen (Tab. 1).

Von den untersuchten Barbituraten besaß somit Amytal-Natrium den stärksten synergistischen Effekt mit Nupercain.

Das Natriumsalz der 5,5-Methylthioäthyl-(2′-pentyl)-thiobarbitursäure (Thiogenal Wz.) und das Natriumsalz der 5,5-Δ^2-Cyclohexenyl-(allyl)-2-thiobarbitursäure (Kemithal Wz.) wirkten erst in schlafauslösender Dosierung, d. h. 15 bzw. 20 mg/kg als 5%ige wässerige Lösung i.v. injiziert, bei 12 Kaninchen für 1 min lang zentralanalgetisch. Demgegenüber wirken schon 0,5 mg/kg des Natriumsalzes der 5,5-Allyl(1-methylbutyl)-thiobarbitursäure (Surital Wz.) i.v. (0,5%ige Lösung) sowie das dem Thiogenal chemisch ähnliche Barbiturat 5,5-Methylthioäthyl-(2′-pentyl)-N-methylbarbitursaures Natrium in der Dosierung von 2 mg/kg i.v. (1%ige Lösung) sowie Thiopenton-Natrium in der Dosierung von 0,3—0,5 mg/kg i.v. (0,5%ige Lösung) analgetisch. Mit Thiopenton-Na-

trium 1 mg/kg, als 1%ige Lösung i.v. injiziert, konnte eine Analgesiedauer bis zu 6 min erreicht werden.

b) Opiate (auf Grund der Versuche von Slyzis): Es konnte bestätigt werden, daß die lokale Anaesthesie der mit einer wässerigen 0,0002, 0,001 und 0,002%igen Nupercain-Lösung vorbehandelten Cornea durch i.v. Injektion von Morphinum hydrochloricum (M.h.) verstärkt wird; der analgetische Wirkungswert von 3,6 mg/kg M.h. i.v. wurde bei den 3 verwendeten Kaninchen als 100% eingesetzt. Er betrug bei den Kaninchen Nr. 1, 2 und 3 84, 74 und 65 min. Durch Variation der einzelnen

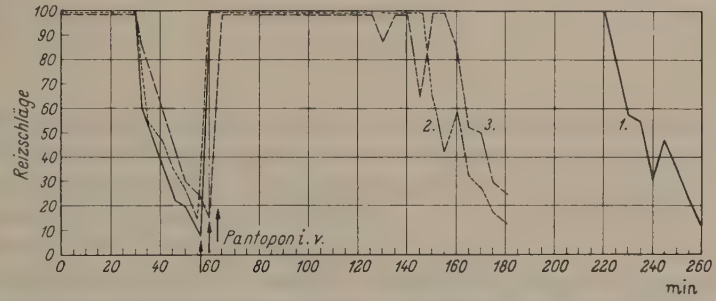


Abb. 1. Nachweis der zentralanalgetischen Wirkung von Pantopon an 3 Kaninchen mit Hilfe des Nupercaintestes. Pantopon (1) 7,2 mg/kg i.v. ———; (2 + 3) 3,6 mg/kg - - - - - und — — —; Nupercain-Lösung: 0,002%ige. Dauer der lokalen Nupercain-Analgesie an der Cornea 28 min

Präparatdosen wurde auf die für das jeweilige Kaninchen charakteristische Morphin-Wirkungsdauer (nach 3,6 mg/kg) eingestellt. Die angewandten Dosen des Nupercains und der Opiate hatten keinerlei Gewöhnungserscheinungen zur Folge.

Die Tab. 2 und 3 zeigen, daß die Opiate Dihydromorphinon (Dilaudid Wz.) und Heroin den stärksten zentralanalgetischen Effekt bei den Versuchen entfalten, während Codein, das salzsaure Äthylmorphin (Dionin Wz.) und Papaverin $^1/_5$ bzw. $^1/_3$ des analgetischen Wirkungswertes des Morphins aufweisen. Pantopon (Wz.) und Laudanon weisen einen stärkeren Effekt auf als ihrem Morphingehalt entspricht (Opiumeffekt im Sinne Straubs) (Abb. 1).

c) Analgetica (nach den Untersuchungen von Plag): Es wurden 2 Präparate geprüft: Acidum acetylosalicylicum und Salicylamid. Acetylsalicylsäure wirkte in der Dosierung 2—20 mg/kg als 0,2%ige wässerige Lösung i.v. injiziert zentralanalgetisch. Höhere Dosen wie 22,5 und 25 mg/kg wirkten erregend und nicht analgetisch.

Salicylamid führte in der Mindestdosierung 0,25—0,5 mg/kg i.v. zu einer kurzdauernden Analgesie. Die 1%ige Lösung enthielt einige Tropfen Äthylalkohol als Lösungsvermittler. Eine entsprechende Kontrollösung ohne Salicylamid war unwirksam.

Tabelle 4. *Nachweis der zentralanalgetischen Wirkung von Acetylsalicylsäure und Salicylamid an 2 Kaninchen. Die Konzentration der Nupercainlösung beträgt 0,0025%.* K.A. = keine Analgesie; *E* = Erregung; Analgesiedauer der Cornea in Minuten

Kaninchen Nr.	Acetylsalicylsäure — Dosierung in mg/kg i.v.								
	1,25	2,0	2,5	5,0	10,0	15,0	20,0	22,5	25,0
3	K.A.	1	2	5	10	14	20	23	5 *E*
4	K.A.	1	3	6	14	16	21	14 *E*	
	Salicylamid — Dosierung in mg/kg i.v.								
	0,15	0,25	0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0
3	K.A.	K.A.	2	3	4	5	8	12	15
4	K.A.	1	4	6	8	11		15	17

d) Cobratoxin (auf Grund der Versuche von Frank): Cobratoxin soll nach Macht beim Menschen eine starke Analgesie nach stundenlanger Einwirkung entfalten. Für unsere Versuche wurde Cobratoxin der Behring-Werke Stärke 1 (1 ml = 2,5 T.E.) verwendet. Mit den Dosen 0,1, 0,125, 0,25 und 0,5 T.E./kg i.v. konnte keine zentrale Analgesie erzielt werden. 0,5 und 0,75 T.E./kg i.v. wirkten zentralerregend und unsicher analgetisch. Durch Änderung der Versuchsanordnung, indem den Kaninchen täglich 0,25 T.E./kg 3 Std vor der lokalen Nupercain-Analgesie verabreicht wurden, konnte eine wesentliche Verlängerung der Hornhautanalgesie im Vergleich zu dem Nupercaineffekt vor der Cobratoxinbehandlung erzielt werden (Tab. 5).

Tabelle 5. *Steigerung des lokalanästhetischen Nupercaineffektes an der Kaninchen-Cornea durch tägliche Vorbehandlung des Tieres mit Cobratoxin (0,25 T.E./kg i.v.) 3 Std vor der Nupercaingabe (0,002%ige Lösung)*

Ausgangswert Dauer d. Analg. (min)	Versuchstage, an denen Cobratoxin verabreicht wurde					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
20	38	40	43	47	50	53

e) Kombinationspräparate: Zum Beweis für die Brauchbarkeit des Nupercaintestes wurden die Arzneimittelkombinationen Veronal-Natrium (Wz.) und Coffeinum-Natrium benzoicum, Veronal-Natrium und Acid. acetylosalicylicum (Aspirin Wz.) sowie Veronal-Natrium und Desoxycorticosteron-Glucosid (Percorten Wz. wasserlöslich) auf zentral-analgetische Wirksamkeit bzw. auf Potenzierung dieses Effektes durch die angeführten Komponenten untersucht. Für diese Versuche wurde jeweils $^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_5$ und $^1/_8$ der niedrigsten, gerade noch analgetischen Einzeldosis der Präparate injiziert. Das Ergebnis zeigt, daß durch die Kombinationen eine Steigerung der analgetischen Wirkung erzielt wird (Tab. 6, Kaninchen Nr. 3, Versuche von Plag).

Tabelle 6. *Nachweis der Potenzierung der analgetischen Wirkung von Kombinationspräparaten mit Hilfe des Nupercaintestes* (K.A. = keine Analgesie)

Präparat	Dosierung der Mischung in bezug auf die minimale analgetische Wirkungsdosis in mg/kg i.v.	Analgesie-Dauer in Minuten
Veronal-Natrium + Coffeinum-Natrium benzoicum	$^1/_8 + ^1/_8 = 1{,}25 + 0{,}16$	K.A.
	$^1/_5 + ^1/_5 = 2 + 0{,}25$	5,0
	$^1/_4 + ^1/_4 = 2{,}5 + 0{,}32$	8,0
	$^1/_2 + ^1/_2 = 5{,}0 + 0{,}64$	15,0
Veronal-Natrium + Aspirin	$^1/_8 + ^1/_8 = 1{,}25 + 0{,}3$	K.A.
	$^1/_4 + ^1/_4 = 2{,}5 + 0{,}62$	5,0
	$^1/_2 + ^1/_2 = 5{,}0 + 1{,}25$	8,0

Entsprechende Versuche mit analgetisch unwirksamen Einzeldosen (die Hälfte einer Dos. eff.) von Veronal-Natrium (5,0 mg/kg i.v.) und Percorten wasserlöslich (0,1 mg/kg i.v.) ergaben, daß bei gleichzeitiger Injektion dieser Dosen eine Analgesiedauer von 3—4 min erreicht wird, aber nur im Sinne eines additiven Effektes.

f) Lokalanaesthetica: Es wurden die Lokalanaesthetica: Salzsaures p-Aminobenzoyl-diäthylaminoäthanol (Novocain Wz.), salzsaures 4-Butylaminobenzoyl-dimethylaminoäthanol (Pantocain Wz.), Para-aminobenzoesäure-3-dimethylamino-1,2-dimethylpropylester (Tutocain Wz.) und α-Butyl-oxycinchoninsäure-diäthylen-diamid-chlorhydrat (Nupercain Wz.) mit Hilfe des Nupercaintestes geprüft. Novocain entfaltete zwar eine deutliche zentralanalgetische Wirkung, aber mit Steigerung der Dosis erfolgte kein gleichmäßiger Anstieg der Analgesiedauer.

Es hatte z. B. in der Dosierung von 0,8 mg/kg i.v. bei dem gleichen Kaninchen (Körpergewicht 3250 g) im Versuch 1 nach einer lokalen Nupercainanaesthesie der Cornea von 2—3 min Dauer, im Versuch 2 und 3 nach einer Nupercainwirkungsdauer von 21 bzw. 20 min in der Dosierung von 1,6 und 3,2 mg/kg einer 1%igen Lösung einen solchen von 13 bzw. 7 min Dauer (Versuche nach WIESSLER).

In einer anderen Versuchsreihe (nach ROHRBACHER) betrugen bei einem Kaninchen die Analgesiewerte nach 0,8, 1,6 und 3,2 mg/kg i.v. 2, 19 und 6 min.

In einer später (1950) an 3 Kaninchen wiederholten Prüfung ergaben sich als niedrigste analgetisch wirksame Novocaindosis (Analgesie von 1 min Dauer) 1 mg/kg i.v. und als wirksamste, aber schon leicht erregende, eine solche von 10 mg/kg mit einer Wirkungsdauer von 13—15 min. Höhere Dosen bis 13 mg/kg wirkten erregend und schwächer analgetisch, 15 mg/kg führten zu Krämpfen (Versuche nach KRISTEN).

Pantocain entfaltete ebenfalls einen zentralanalgetischen Effekt. Jedoch konnten nicht die mit Novocain erreichten Wirkungszeiten erzielt werden, da bei höherer Dosierung Pantocain stark zentralerregend wirkt.

0,2 mg/kg Pantocain i.v. in 0,1%iger wäßriger Lösung entfalten eine 1—2 min anhaltende zentrale Analgesie, 0,4 mg/kg bzw. 0,6 mg/kg eine solche von $2^1/_2$—4 und 3 min, wobei jedoch bereits toxische Erscheinungen auftraten.

Tutocain führte in der Dosierung 0,4 mg/kg nach i.v. Injektion bei den mit Nupercain vorbehandelten Kaninchen zu einer 5 min anhaltenden Analgesie.

Mit höheren Dosen (bis 3,0 mg/kg) konnten keine einheitlichen Analgesiezeiten erzielt werden. Diese schwankten zwischen 1½—7 min, 4 mg/kg ließen ohne toxische Effekte keine Analgesie in Erscheinung treten und 5 mg/kg wirkten krampfauslösend und zum Teil tödlich.

Nupercain übte ebenfalls bei den mit dem gleichen Präparat in der beschriebenen Art vorbehandelten Kaninchen in Dosen, die noch nicht zentralerregend wirken, einen analgetischen Effekt aus.

So wurden bei einem Versuchstier nach 20, 100, 150 und 200 γ/kg Nupercain i.v. (0,1%ige Lösung) Analgesiezeiten von 2½, 7, 9 und 11 min erreicht. Nach 400 γ/kg Nupercain i.v. betrug die Analgesiedauer zwar 17 min, aber die Testwerte waren unsicher. 500 γ/kg waren toxisch bei einer festgestellten Schmerzlosigkeit von 4 min (Versuche von Rohrbacher).

g) Antihistaminica: Die Antihistaminica: Benzyl-(α-pyridyl)-dimethyl-äthylendiamin-hydrochlorid (Pyribenzamin Wz.) und 2-Phenylbenzyl-amino-methyl-imidazolin-methansulfonat (Antistin Wz.) weisen eine mäßige zentralanalgetische Wirksamkeit bei Kaninchen auf.

Nach i.v. Injektion von 0,2 mg/kg Pyribenzamin wurde eine ½ min anhaltende Analgesie (Summationsreizzahl 100), nach 0,5 und 0,75 mg/kg i.v. eine solche von 5 min Dauer, und nach der toxischen Dosis 1,0 mg/kg i.v., einer Krampfdosis, konnte keine Analgesie mehr festgestellt werden. Antistin ist schwächer analgetisch wirksam als Pyribenzamin. 0,2 mg/kg Antistin i.v. führten zu keiner vollkommenen Analgesie (z. B. nur auf 55 Summationsreize); erst mit 0,5 und 0,75 mg/kg i.v. ließ sich eine 4 bzw. 1 min anhaltende Analgesie erzielen. 1,0 mg/kg Antistin i.v. wirkte nicht analgetisch und leicht toxisch. (Erschlaffung der Skelettmuskulatur und flache Atmung; Untersuchung von Rohrbacher.)

1-(2'-Pyridyl)-1-(p-chlorphenyl)-3-dimethylamino-propanmaleat (Chlortrimeton Wz.) und 1-(2'-Pyridyl)-1-(p-bromphenyl)-3-dimethylaminopropan-maleat (Ilvin Wz.) entfalten dagegen schon nach 50 γ/kg i.v. einen analgetischen Effekt von 2 min Dauer und sind hiermit sehr stark wirksame Analgetica. Das salzsaure Salz des N-(2'-dimethylamino-2'-methyl-äthyl)-phenothiazins (Atosil Wz.) führte erst in der Dosierung 0,2 mg/kg i.v. eine Verstärkung der lokalen Nupercainwirkung für die Dauer von 2—4 min herbei (Summationsreizzahl 100).

h) Belladonnaalkaloide, Harmin, Parkinsonmittel: Atropinsulfat (0,2%ige Lösung) bewirkte bei 3 Kaninchen in der Dosierung 30 γ/kg eine zentrale Analgesie von 2 min Dauer.

400 γ/kg i.v. wirkten erregend und nicht analgetisch (Versuche von König). Bei der i.v. Infusion von Atropinsulfat in Dosen ½—8 mg/kg innerhalb von 30 min war mit Hilfe des Nupercaintestes keine zentrale Analgesie nachweisbar (Versuche von Franz).

Scopolaminhydrobromid entfaltete bei der Dosierung 5 γ/kg i.v. keinen, nach 10 γ/kg einen unsicheren und nach 20 γ/kg einen deutlichen

zentralanalgetischen Effekt von 3—4 min Dauer. 40 γ/kg und bei einem Tier auch 50 γ/kg führten zu einer 10—12 min anhaltenden Empfindungslosigkeit. Ab 45 γ/kg konnte mit Ausnahme von einem Tier keine Analgesie mehr nachgewiesen werden.

Belladonninbisulfat (Bellacristin Wz.) wirkte entsprechend der Dosissteigerung von 20—70 γ/kg i.v. 1—7 min lang analgetisch. Mit 80 γ/kg i.v. wurde die Summationsreizzahl in dieser Versuchsreihe nur einmal erreicht (Versuche von König).

Isoäthionsaures Harmin (Merck) in 0,1%iger wässeriger Lösung ließ in der Dosierung 50—100 γ/kg i.v. keine Analgesie erkennen. Mit 150, 200, 300, 400, 500 und 600 γ/kg wurde eine Analgesie von $^3/_4$, 4, 5, 8, 9 und 10 min erreicht; 650 und 750 γ/kg i.v. wirkten nicht mehr analgetisch.

Mit Scopolaminbrombutylat (Buscopan Wz.) in der Dosierung von 100, 200, 300 und 400 γ/kg i.v. wurde bei 4 Kaninchen eine Analgesiedauer von 2, 3, 4 und 5 min erzielt. 500 γ/kg zeigten einen unsicheren und 600 γ/kg überhaupt keinen analgetischen Effekt (Versuche von König).

Die schmerzlindernde Wirkung von 1-Phenyl-cyclopentan-1-carbonsäure-diäthylamino-äthylester-hydrochlorid (Parpanit Wz.) trat in unseren Versuchen nach Dosen von 0,5, 0,75, 1,0, 1,25 und 1,5 mg/kg i.v. für die Dauer von 2, 3, 20, 23 und 25 min in Erscheinung. Die Dosen 1,0—1,5 mg/kg ließen zwar eine lange Analgesiezeit erkennen, aber der analgetische Effekt wurde durch zentrale Erregungszustände unterbrochen und war daher oberflächlich. Die Verabreichung von 1,75 und 2,0 mg/kg Parpanit war von stärkeren Vergiftungserscheinungen begleitet und ohne analgetischen Effekt. Durch Vorbehandlung der Kaninchen mit 20 mg/kg Nicotinsäureamid i.m., 10 min vor der Parpanitgabe, konnte aber eine analgetische Wirkung mit diesen toxischen Parpanitdosen für die Dauer von 20—22 min erzielt werden. Jedoch blieben die toxischen Wirkungen des Präparates erhalten. Nicotinsäure (20 mg/kg i.m.) und Chininsulfat (30 mg/kg i.m.) beeinflußten den analgetischen Effekt von Parpanit nicht. Dagegen ließen sich mit Luminal-Natrium (20 mg/kg i.m.), 10 min vor der Parpanitgabe (1,75—2,5 mg/kg) verabreicht, die Erregungszustände unterdrücken und die Analgesiedauer verlängern (28—42 min); 2,75 und 3,0 mg/kg Parpanit lösten trotz Vorbehandlung der Versuchstiere mit Luminal-Natrium Erregungszustände aus (Versuche nach Rohrbacher).

i) Muskelrelaxantia: Mit d-Tubocurarin konnte in Dosen, die noch keine Lähmungserscheinungen auslösten (5—40 γ/kg i.v.), ferner auch mit Roh-Curare (100—600 γ/kg i.v., Kopfhängedosis 0,7—0,8 mg/kg i.v.) ein analgetischer Effekt erzielt werden (4—20 min). Im Gegensatz zu

d-Tubocurarin geht bei Roh-Curare mit höherer Dosierung die analgetische Wirkung in eine muskellähmende über. d-Tubocurarin entfaltet dagegen in den noch nicht lähmenden Dosen von 40—140 γ/kg i.v. eine zentralerregende Wirkung. Nach 20 γ/kg d-Tubocurarin i.v. traten bei den Kaninchen neben der Analgesie Pupillenerweiterung und Exophthalmus auf (Versuche nach Lehnert und Wiessler).

Da d-Tubocurarin je nach Dosierung analgetisch oder zentralerregend wirkt, wurde geprüft, ob durch Analeptica wie Pentamethylen-tetrazol (Cardiazol Wz.), Pyridin-β-carbonsäure-diäthylamid (Coramin Wz.), Lobelin und 1-Phenyl-2-methyl-amino-propan-hydrochlorid (Pervitin Wz.) die d-Tubocurarinanalgesie durchbrochen werden kann. In einer Dosierung, die nicht toxisch wirkt, entfalten jedoch die angeführten Stoffe weder einen synergistischen noch einen antagonistischen Effekt (Cardiazol 2,5—8 mg/kg i.v., Coramin 5—20 mg/kg i.v., Lobelin 0,5 bis 1,0 mg/kg i.v., Pervitin 1,5 mg/kg i.v.). Nur mit einer toxischen, knapp unterhalb der Convulsivdosis liegenden Cardiazolmenge gelang es, die Analgesie zu durchbrechen (Schulenberg).

Für Coramin betrug die entsprechende antagonistisch, aber unsicher wirksame Dosis 27,5 mg/kg i.v., die außerdem Muskelzittern und eine starke Erregung auslöste und für Lobelin 1,25 mg/kg i.v. Nach dieser Lobelinmenge reagierten nur 2 von 3 Versuchstieren mit einer Verkürzung der Analgesiezeit. Da bekanntlich Lobelin sehr kurzdauernd (etwa 2—3 min) wirkt, so erfolgte auch in unseren Versuchen nach dieser Zeit ein rascher Wiederanstieg der Analgesietiefe (z. B. auf 80—90 Summationsreize). Die Erholungszeit nach d-Tubocurarin wurde durch Lobelin nicht beeinflußt. 1,5 mg/kg Lobelin i.v. führten zu Krämpfen und Lähmungserscheinungen (Seitenlage). Die Pervitindosen, die zu starker Erregung der Tiere führten, ermöglichten technisch keine Testung der Analgesiedauer (Versuche von Schulenberg).

Auch mit Decamethonium in Dosen von 40 und 50 γ/kg i.v. ließ sich eine Analgesie von 3 und 5 min Dauer erzielen, dagegen nicht mit Tetraäthylammoniumbromid in der Dosierung 0,3—1,6 mg/kg sowie mit Tolyl-glycerin-äther (Myanesin Wz., Infusion von 6—45 mg/kg in 30 min; Versuche nach Franz u. König).

In einer anderen Versuchsserie erreichten Lehnert u. König bei Infusion von Myanesin zwar eine Analgesie von 12—14 min Dauer, jedoch gewöhnten sich die Versuchstiere bei wiederholter Verabreichung des Präparates im Laufe von 9 bis 12 Tagen, und die verwendete Myanesindosis war dann wirkungslos.

k) Phenothiazinderivate: Untersucht wurden das salzsaure Salz des N-(2′-Dimethylamino-2′-methyl)-äthyl-phenothiazins (Atosil Wz.), N-(3′-Dimethyl-amino)-propyl-3-chlor-phenothiazin (Megaphen Wz.), N-Methyl-piperidyl-3-methyl-phenothiazin (Pacatal Wz.) und N-(2′-Diäthylaminoäthyl)-phenothiazin (Latibon Wz.) sowie die Kombinationen Megaphen-Eukodal und Pacatal-Eukodal. Aus der Tab. 7 ist zu ersehen, daß das Megaphen der Dosis, nicht der Intensität nach, etwa 6,6—8mal stärker zentralanalgetisch wirkt als Dihydrooxycodeinonchlorhydrat (Eukodal Wz.). In der Kombination Megaphen-Eukodal ist der analgetische Effekt bis zu 50% verstärkt, denn die Analgesiezeiten liegen entsprechend höher als die Summe der Analgesiezeiten beider Präparate nach getrennter Verabreichung. Die überadditive Steigerung der analgetischen Wirkung der Kombination Pacatal-Eukodal ist weniger stark

ausgeprägt. Pacatal selbst übte einen stärkeren schmerzlindernden Effekt aus als Eukodal. Latibon wirkte etwa wie Pacatal, während Atosil eine etwa 2,5mal schwächere analgetische Wirkung aufwies als Eukodal.

Tabelle 7. *Analgetische Wirksamkeit von Eukodal, Megaphen, Atosil, Latibon und Pacatal an Kaninchen nach Vorbehandlung mit Nupercain (0,0025%ig) (Cornealtest)*

Präparat	Dosis in mg/kg i.v.	Zahl der Versuche	Dauer der Analgesie in min (Mittelwert und mittl. Fehler)
Megaphen	0,05	7	1,85 ± 0,4
	0,06	6	3,0
	0,1	8	3,0 ± 0,4
	0,12		6,0 ± 0,89
	0,25	6	14,3 ± 0,95
	0,5	2	22,0
Eukodal	0,2	6	1,0 ± 0,0
	0,4	6	2,3 ± 0,3
	0,8	5	6,0 ± 0,63
Megaphen + Eukodal	0,1 + 0,2	20	5,3 ± 0,51
	0,12 + 0,8	6	18,0 ± 0,89
Pacatal	0,1	8	1,5
	0,2	5	3,2 ± 0,49
	0,4		5,3 ± 0,42
Pacatal + Eukodal	0,2 + 0,4	6	7,3 ± 0,67
	0,4 + 0,8	6	14,0 ± 0,73
Latibon	0,1	8	1,0 ± 0
	0,15	8	2,0 ± 0,27
	0,2	8	3,1 ± 0,4
Atosil	0,5	6	1,0 ± 0
	0,6	8	1,25 ± 0,164

l) Coffeinum-Natrium benzoicum: In unseren Versuchen reagierten die Kaninchen sehr verschieden auf Coffein-Natrium benzoicum (10%ige wäßrige Lösung). So z. B. wirkten bei einem Tier 1,25, 2,5, 5,0, 10 und 15 mg/kg i.v. 8, 30, 37, 44 und 49 min lang analgetisch, höhere Dosen dagegen nicht. Ein zweites Kaninchen sprach erst auf 15—45 mg/kg mit einer analgetischen Wirkung an (Versuche von Plag).

m) Secale-Alkaloide: Ergotaminbitartrat (Gynergen Wz.) (0,45 und 0,6 mg/kg i.v.), Dihydroergotamin (0,5 mg/Tier), Dihydroergocristin (1,0 mg/kg i.v.) und Hydergin (Wz., 0,6 mg/Tier) entfalteten in unserem Test bei 5 Kaninchen an sich keinen eindeutigen analgetischen Effekt. Dagegen wurde die lokale Nupercain-anaesthesie an der Cornea durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit 0,5 mg/Tier Dihydroergotamin oder 0,45 mg/Tier Hydergin i.v. aufgehoben oder abgeschwächt. Mit 1 mg/kg Gynergen i.v. konnte dieser antagonistische Effekt nicht erzielt werden. Ähnlich wurde auch die lokalanaesthetische Wirkung des Novocains (2%ige Lösung) an der Hornhaut durch die Vorbehandlung der Tiere mit 0,5 mg/kg Dihydroergotamin abgeschwächt (Versuche nach Brinkmann).

2. Nachweis von lokaler Gefühllosigkeit der Cornea durch wiederholte i.v. Injektionen von Nupercain oder Novocain an Kaninchen nach Vorbehandlung mit Eukodal und Dolantin

Diese Versuche sollen zeigen, daß auch durch wiederholt i.v. zugeführtes Nupercain oder Novocain der zentralanalgetische Effekt von Eukodal und 1-Methyl-4-phenyl-piperidin-4-carbonsäure-äthylester (Dolantin Wz.) bei Kaninchen gesteigert werden kann. Es entstand weiter die Frage, wieviel i.v. Injektionen z. B. von Novocain in 5minütigen Abständen notwendig sind, damit noch eine Cornea-Anaesthesie von 3 bis 4 min Dauer nachweisbar wird, und welches die Mindestdosen der beiden zur Anwendung kommenden Mittel sind. Die Versuche wurden an 4 empfindlichen und gleichmäßig reagierenden Kaninchen (3—4 kg Körpergewicht) ausgeführt.

Die einmalige i.v. Verabreichung einer hohen Eukodaldosis (15 mg/kg) führte in unseren Versuchen zu keiner 100%igen Analgesie der Cornea (15—20 Summationsreize), obwohl bereits die Atemfrequenz auf 50—60 Atemzüge pro Minute gesunken war, und die Tiere eine starke Cyanose aufwiesen. Als Testdosen wurden 0,8, 0,4 bzw. 0,2 mg/kg Eukodal i.v. verabreicht. Wie aus der Zusammenstellung zu ersehen ist, sind bei den höheren Dosen von Eukodal weniger Injektionen von Nupercain und Novocain notwendig, um eine 100%ige Anaesthesie der Cornea für die Dauer von 3—4 min zu erzielen, als wenn die beiden Lokalanaesthetica allein verabreicht werden.

Die allgemeine Gefühllosigkeit trat bei folgenden Kombinationen auf:

Tabelle 8

Eukodal mg/kg i.v.	+ Nupercain mg/kg i.v. in 5 min Abst.	Zahl der Nupercaininjektionen
0,8	+ 0,2	1 (1 Tier von 4)
0,8	+ 0,1	2—4
0,8	+ 0,05	3—6
0,8	+ 0,025	3—5
0,4	+ 0,1	6
0,4	+ 0,05	3
0,4	+ 0,025	4
0,2	+ 0,05	3
0,2	+ 0,025	6
Eukodal mg/kg	**+ Novocain mg/kg i.v. in 5 min Abst.**	**Zahl der Injektionen**
0,8	+ 0,8	4—6
0,8	+ 0,6	10
0,4	+ 0,8	3—6

Eine weitere Verminderung der Eukodaldosis auf 0,2 mg/kg i.v. führte bei wiederholter Injektion von 0,8 mg/kg Novocain in 5minütlichen Abständen zu keiner

100%igen Analgesie mehr. 0,4 mg/kg Eukodal i.v., eine bei diesen Kaninchen an sich analgetisch unwirksame Dosis, ist hiermit in dieser Versuchsanordnung eine Mindestdosis.

Die Nupercaindosis 0,2 mg/kg i.v. (2—4 mg/kg i.v. = Dos. let., 0,4 mg/kg = Dos. conv.) führte bei 3 von 4 Kaninchen zu Erregungszuständen, aber zu keiner zentralen Analgesie. Bei der Dosierung 0,1 mg/kg i.v. traten die toxischen Erscheinungen nicht auf, und die zentrale Analgesie war bei den mit Eukodal vorbehandelten Tieren 100%. Eine grobe Testung der allgemeinen Schmerzempfindlichkeit durch Kneifen in eine Extremität ergab, daß die Tiere bei Bestehen einer 100%igen Analgesie der Cornea auch sonst keinerlei Zeichen des Schmerzes oder Unbehagens äußerten.

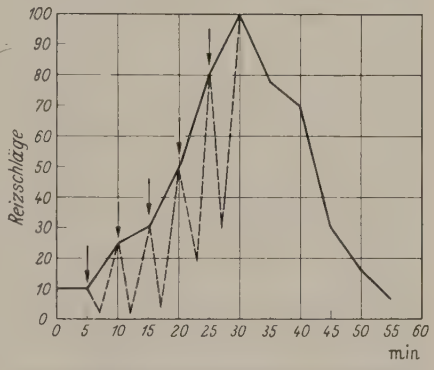


Abb. 2. Nachweis der Steigerung der zentralanalgetischen Wirkung von wiederholten i.v. Novocaininjektionen (0,8 mg/kg in 5 min-Abständen) nach Vorbehandlung des Kaninchens mit Eukodal (0,8 mg/kg i.v.)

Wurde an Stelle von Eukodal mit Dolantin vorbehandelt (0,8 und 0,6 mg/kg i.v.), so trat nach wiederholten Novocaininjektionen (0,8 mg/kg i.v. in 5minütlichen Abständen) wegen der zentralanaleptischen Wirkung ein geringerer zentralanalgetischer Effekt als mit 0,4 mg/kg Dolantin i.v. auf. Die allgemeine Gefühllosigkeit ließ sich bei folgenden Dolantin-Nupercain- bzw. Novocain-Kombinationen feststellen:

Tabelle 9

Dolantin mg/kg	Nupercain mg/kg i.v. in 5 min Abst.	Zahl der Injektionen
0,4	+ 0,025 (K.T 2)*	3
0,4	+ 0,05 (K.T 3)	3
0,4	+ 0,4 (K.T 4)	4
0,2	+ 0,025 (K.T 2)	4
0,2	+ 0,05 (K.T 3)	4
	Novocain	
0,8	+ 0,8	7—10 (2 von 4 Tieren)
0,6	+ 0,8	2— 9
0,4	+ 0,8	3— 5

* K.T = Bezeichnung des Kaninchens.

Die Untersuchungen des Anaesthesieanstieges (Summationsreizzahl) nach den wiederholten Injektionen von Nupercain und Novocain bei den mit Dolantin oder mit Eukodal vorbehandelten Tieren haben ergeben, daß entsprechend ihrem Blutspiegel nach jeder Injektion zunächst ein plötzliches Absinken der notwendigen Zahl der Summationsreize erfolgt.

Beispielsweise waren 2—3 min nach der ersten Nupercain- oder Novocaininjektion 30 Summationsreize erforderlich, nach der 2. Injektion dagegen nur noch 5 oder 10 Reize. Diese Verminderung der bereits vorhandenen Anaesthesie — durch die rasche analeptische Wirkung des Lokalanaestheticums erklärbar — wurde nach einigen Minuten wieder durch einen Anstieg in der Summationsreizzahl abgelöst. Es war somit ein ständiges Wechselspiel von Anaesthesieabfall und erneutem höheren Anstieg, das schließlich nach wiederholten Injektionen zu einer 100%igen Anaesthesie führte (Versuche von Schiff) (Abb. 2).

Besprechung

Die vorliegende zusammenfassende Arbeit hat den Nachweis erbracht, daß der im Jahre 1947 zum ersten Male beschriebene und mit der Dissertation von Slyzis bekannt gewordene Nupercaintest an der Kaninchencornea eine sehr brauchbare Versuchsanordnung zur Prüfung der zentralanalgetischen Wirkung ist. Im Vergleich zu anderen Prüfungsmethoden ist das beschriebene Verfahren ein sehr empfindlicher Indicator auch für Analgetica von schwächerer Wirksamkeit. Pharmaka aus den verschiedensten Stoffklassen können hiermit nicht allein qualitativ, sondern auch quantitativ auf ihre schmerzlindernden Eigenschaften geprüft werden. Die Methode ist so verläßlich, daß unbekannte Dosen der Analgetica damit bestimmt werden können.

Wird das Wirkungsbild der morphinähnlich wirkenden Analgetica mit dem der anderen verglichen, so kann man mit Schaumann sagen, daß der Angriffspunkt in der automatischen Regulation des „protektiven Systems" im Sinne einer Lähmung des Abwehrreflexes (Lidschluß) liegt, so daß der auslösende Reiz (Reizhaar) kein erlebtes Schmerzgefühl verursachen kann.

Die vorliegenden Versuche erbrachten auch den Nachweis, daß durch Kombination von Megaphen mit dem Opiat Eukodal eine gewisse Potenzierung der analgetischen Wirksamkeit ermöglicht wird (vgl. Wirth). Bei den geprüften Thiobarbituraten entfalteten Thiogenal, Kemithal, Surital, Thiopenton- und Amytal-Natrium eine analgetische Wirkung, während die Barbiturate Luminal und Evipan-Natrium unwirksam waren.

Es ist eine bemerkenswerte Beobachtung, daß gerade die analgetisch wirksamen Spitzenpräparate der oben angeführten i.v. injizierbaren Kurznarkotica zur Narcoanalyse verwendet werden, daß weiterhin das stärkste unter ihnen, nämlich Amytal-Natrium, eine Vorzugsstellung bei der Behandlung Manisch-Depressiver einnimmt (Lindemann).

Durch zentralerregende Mittel konnte die zentrale Analgesie häufig unterbrochen werden. Die Wirkungsdosen waren meist gleichzeitig die toxischen.

Unsere Versuche, die sich über viele Jahre hinzogen und die seit dem Jahre 1947 in Dissertationen niedergelegt wurden, stehen in Einklang mit den Befunden von Charonnat und Lechat, welche mit einer ähnlichen Versuchsanordnung eine große Reihe entsprechender Präparate untersucht haben, jedoch liegen die von diesen Autoren verwendeten Dosen wesentlich höher als die unsrigen.

Zusammenfassung

1. Der Nupercaintest beim Kaninchen, eine modifizierte Régnier-sche Methode zur Prüfung zentraler Analgesie, wird beschrieben.

2. Mit Hilfe dieses Testes wurde die zentralanalgetische Wirkung von Opiaten, Barbituraten, Äther, Äthylalkohol, Cobratoxin, Coffein, Acetylsalicylsäure und Salicylamid gemessen.

3. Zentralanalgetische Wirkungen entfalten auch Lokalanaesthetica, Muskelrelaxantia, Atropinsulfat, Scopolaminum hydrobromicum, Belladonninbisulfat, Butylscopolaminbromid, isoäthionsaures Harmin (Merck), Antihistaminkörper, sowie Phenothiazinderivate.

4. Ein gewisser potenzierter zentralanalgetischer Effekt wurde nachgewiesen in der Kombination Megaphen-Eukodal; deutlicher in Kombinationen von Veronal-Natrium mit Acetylsalicylsäure und Coffein.

5. Der zentralanalgetische Effekt kann häufig durch zentralerregende Stoffe wie Coramin, Cardiazol und Novocain aufgehoben werden.

6. Allgemeine Empfindungslosigkeit läßt sich erzielen durch wiederholte i.v. Injektion von Novocain nach Vorbehandlung der Kaninchen mit Eukodal oder Dolantin.

7. Durch Vorbehandlung der Tiere mit Dihydroergotamin und Hydergin wird der lokalanaesthetische Effekt von Novocain an der Cornea abgeschwächt bis aufgehoben.

Literatur

Brinkmann, Chr.: Weitere Untersuchungen mit Novocain und Percain unter dem Einfluß von Mutterkornalkaloiden (Gynergen, Dihydroergotamin (DHE) und Hydergin (CCK) an der Kaninchen-Cornea, Dissertation Heidelberg 1953. — Charonnat, R., et O. Lechat: Sur le phénomène de réveil de l'anesthésie cornéenne, Thérapeutique **8**, 704 (1953). — Eichholtz, F.: Lehrbuch der Pharmakologie, 7. Aufl. Heidelberg—Berlin: Springer 1951. — Über die atmungslähmende Wirkung der Opiate. Dtsch. med. Wschr. **1940**, Nr. 29, S. 792. — Die Anwendung von Novocain in der inneren Medizin. I. Teil: Zur Pharmakologie. Klin. Wschr. **1950**, 761. — Diskussionsbemerkung zum Vortrag von W. Koll: Messung analgetischer Wirkungen durch elektrische Zahnpulpareizung am Hund. 18. Tagung der Dtsch. Pharmakol. Ges. in Mainz 1951. Arch exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 89 (1952). — Eichholtz, F., u. W. Krauth: Über das Zusammenwirkungen von Cocain und Opiumalkaloiden. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **184**, 667 (1937). — Frank, M.: Untersuchungen über die analgetische und anaesthetische Wirkung des Nebennierenrinden-Hormons Desoxycorticosteron und zweier verwandter Steroide Progesteron und Testosteron sowie des tierischen Giftes Kobratoxin. Dissertation Heidelberg 1952. — Franz, E.: Untersuchungen über die zentral-analgetische Wirkung des Sedativums: Recvalysat, der Barbitursäuren: Phanodorm, Luminal, Veronal, Evipan, Pentothal, Amytal, der Schlafmittel: Paraldehyd und Alkohol, des Inhalationsnarkoticums: Äther, sowie der Stoffe: Atropin und Myanesin bei i.v. Infusion. Dissertation Heidelberg 1951. — Hardy, J., H. Wolff and H. Goodell: Studies on pain. A new method for measuring pain threshold: Observations on the spatial summation of pain. J. Clin. Invest. **19**, 649 (1940). — Pain Sensations and

Reactions, Baltimore: Williams and Wilkins Comp., 1952. — Hoffmann, G., u. E. Witte: Dauerinfusionsgerät mit Uhrwerksantrieb. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 221 (1950). — Keil, W., u. A. Kluge: Über die Anwendung des Mäuseschwanzphänomens zur Auswertung von Morphin- und Scopolaminpräparaten. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **174**, 493 (1934). — Keil, W., u. G. Hepp: Über Verstärkung der Lokalanaesthesie durch Morphium. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **179**, 420 (1935). — Keil, W., u. F.-H. Pöhls: Über Analgesie und Atemwirkung der Morphingruppe. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 285 (1936). — Koll, W., u. H. Reffert: Eine neue Methode zur Messung analgetischer Wirkungen im Tierversuch. Versuche mit Morphin und einigen Morphinderivaten am Hund. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **190**, 687 (1938). — König, H.: Untersuchungen über die zentralanalgetische Wirkung der Antiparkinsonmittel, verschiedener Lokalanaesthetica und Curare-ähnlicher Stoffe bei i.v. Injektion und Infusion am Kaninchen. Dissertation Heidelberg 1950. — Kristen, K.: Die Beeinflussung der zentralanalgetischen Wirkung von Novocain durch Luminal und einige Purinkörper sowie vergleichende Untersuchungen neuerer Lokalanaesthetica. Dissertation Heidelberg 1950. — Lehnert, K.-H.: Untersuchungen über die paralytische, analgetische und lissive Wirkung von Curare-artigen Substanzen unter Verwendung neuer und alter Testierungsmethoden. Dissertation Heidelberg 1950. — Lindemann, E.: Psychological changes in normal and abnormal individuals under the influence of Sodium Amytal. Amer. J. Psychiatry **11**, 1080 (1932). — Plag, M.: Untersuchungen über die analgetische und lokalanaesthetische Wirkung von Antipyretica, Mischpulvern, Steroiden und ACTH. Dissertation Heidelberg 1953. — Régnier, J.: Essai de mesure de l'anesthésie produite sur les terminaisons nerveuses de la cornée par les anesthésiques locaux. Comparaison des pouvoirs anesthésiques de la cocaine, de la novocaine et de la stovaine. C. r. Acad. Sci. Paris **177**, 558 (1923). — Rohrbacher, M.: Untersuchungen über die zentralen Wirkungen verschiedener Lokalanaesthetica, Antihistaminkörper und Analgetica. Dissertation Heidelberg 1949. — Slizys, S.-M.: Vergleichende Untersuchungen über den Wirkungswert der Stoffe der Opiumgruppe mit einer neuen tierexperimentellen Methode. Dissertation Heidelberg 1947. — Schaumann, O.: Analgetica und „protektives" System, Naturwissenschaften **41**, 96 (1954). — Schiff, O.: Über allgemeine Gefühllosigkeit nach intravenöser Zufuhr der Lokalanaesthetica. Dissertation Heidelberg 1948. — Schulenberg, D.: Weitere Untersuchungen über die d-Tubocurarin-Analgesie. Dissertation Heidelberg 1952. — Stender, O., u. C. Amsler: Beiträge zur Kenntnis der Morphingewöhnung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **160**, 195 (1931). — Straub, W.: Die pharmakodynamische Wirkung des Narkotins im Opium. Biochem. Z. **41**, 419 (1912). — Strughold, H.: The mechanical threshold of the corneareflex of the usual laboratory animals. Amer. J. Physiol. **94**, 235 (1930). — Weiss, A.: Über die Wirkungsbedingungen des Novocains. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **167**, 177 (1932). — Wiessler, H.: Untersuchungen über die zentralanalgetische Wirkung der Stoffe Curare — Novocain — Pantocain und der L. A. G 1—G 10. Dissertation Heidelberg 1949. — Wirth, W.: Methoden der Analgesieprüfung am Tier. 18. Tagung d. Dtsch. Pharmakol. Ges. in Mainz 1951, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **216**, 77 (1952). — Versuche zur kombinierten Wirkung von Megaphen mit stark wirksamen Analgeticis. 20. Tagung d. Dtsch. Pharmakol. Ges. in Bonn 1953. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 75 (1954).

Privatdozent Dr. R. Hotovy, E. Merck A.G., Darmstadt, Pharmakolog. Laboratorien

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 403—413 (1956)

Aus der Medizinischen Univ.-Klinik und Poliklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. Schoen)

Die Resorptionsweise von Aminosäuren aus dem Dünndarm*

Von
F. Hartmann, H. Lenz, C. Lopez-Calleja und H. Münzenberg

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. November 1955)

Die Hauptmenge des Nahrungseiweißes wird durch die Pancreasproteasen zu Aminosäuren gespalten und in dieser Form resorbiert. Sowohl der Amino-N wie die Aminosäuren konnten nach Eiweißfütterung im Darm erhöht nachgewiesen werden[1,13]. Jedoch vermag auch das pancreaslose Tier noch etwa die Hälfte des zugeführten Eiweißminimums zu resorbieren[4]. Aus diesen Beobachtungen muß man schließen, daß auch die *Darmwand* Eiweiß in eine resorptionsfähige Form bringen kann, sei es, daß sie einen Teil des Eiweißes bis zu den Aminosäuren aufspaltet, sei es, daß auch Peptide oder unter solchen pathologischen Bedingungen sogar genuine Eiweiße die Darmwand passieren, wie es bei homologem Serumeiweiß sicher die Regel ist[3].

Die Resorption von Aminosäuren im Dünndarm ist ein aktiver Vorgang[6]. Er ist unabhängig vom Konzentrationsgefälle Chymus-Pfortaderblut, von der relativen Konzentration der einzelnen Aminosäuren in einem Gemisch und von der Diffusionskonstante. So betragen z. B. die Diffusionskonstanten ($D_{20} \times 10^{-7}$ bei 20° C) für Glykokoll 95,00, für d-l-Alanin 83,0, für d-l-Valin 73,0 und d-l-Leucin 63,0[11]. Bei der Ratte beträgt die Resorption in Milliäquivalent/100 g Tier bei Glykokoll 0,84, Alanin 0,54, Valin 0,4, Leucin 0,34[2]. Die Resorptionsgeschwindigkeit ist also für jede Aminosäure spezifisch, ist jedoch, wie die aufgeführten Zahlen zeigen, um so größer, je größer die Diffusionskonstante ist. Immer aber ist die Permeationsgeschwindigkeit kleiner als man nach der Molekulargröße erwarten sollte[12]. Da das auch für Kollodiummembranen gilt, muß man diese Beobachtung auf den Ampholytcharakter der Aminosäuren mit der Bildung einer Wasserdipolschale zurückführen. Anderer-

* Die Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

seits ist die Permeation durch die Darmwand schneller, als man auf Grund der Diffusionsgeschwindigkeit durch Membranen erwarten sollte[7]. Dieser Befund und die Beobachtung, daß bei Aminosäuren wie bei Zuckern die absolut resorbierte Menge an der lebenden Darmschlinge im Gegensatz zur abgetöteten weitgehend konstant bleibt[5], sprechen für eine aktive Resorption. Aminosäuren im Gemisch behindern sich gegenseitig, so daß eine Aminosäure aus einem Gemisch langsamer resorbiert wird, als die Aminosäure allein[14]. Sauerstoffmangel senkt die Resorption[10], Nebennierenrindenexstirpation ebenfalls, aber für die einzelnen Aminosäuren unterschiedlich[8]. Schädigung der Darmschleimhaut hebt die Spezifität des individuellen Resorptionsvorganges auf. Die resorbierten Aminosäuren erscheinen zum größten Teil in der Pfortader.

Die wesentlichen Vorgänge der Eiweißresorption sind 1948 und 1949 mit der papierchromatischen Methode von Dent und Schilling[3] untersucht worden. Danach scheint beim Hund nur heterologes Eiweiß bis zu den Aminosäuren aufgespalten zu werden. Diese erscheinen nach Caseinverfütterung in der gleichen Verteilung, wie sie auftritt, wenn man ein Caseinhydrolysat in vitro dem Blut beimischt. Die Arbeiten von Dent sind aber lediglich qualitativer Natur. Sie bedürfen deswegen einer Ergänzung hinsichtlich Resorptionsgeschwindigkeit und -größe der einzelnen Aminosäuren. Diese Fragestellung liegt den folgenden Experimenten zugrunde.

Methode

Für die Versuche wurden 16, meist große Hunde vom Gewicht 20—25 kg in Pernoctonäthernarkose verwandt, bei denen die zu erwartenden Blutverluste in Anbetracht der gesamten Blutmenge nicht ins Gewicht fielen. Bei kleineren Tieren wurde eine laufende Bluttransfusion in die Vena femoralis gegeben. An 3 Hunden wurde die Arteria mesenterica aus der Femoralvene eines Spendertieres mit einem Polyvinylschlauch gespeist. Am Versuchstier wurde nach Heparinisierung und Laparatomie die oberste Dünndarmschlinge dargestellt. In einen großen Ast der abführenden Mesenterialvene wurde ein mit Gummimandrin versehener Polyvinylschlauch eingebunden. Das Lebervenenblut wurde aus einem Herzkatheter entnommen, der vor der Operation unter Röntgenkontrolle durch die rechte Vena jugularis in die Lebervene eingeführt war. Blutentnahmen von je 10 cm³ aus Mesenterial- und Lebervene. Injektion von 100 cm³ einer 50%igen Aminosäurelösung (Aminovit) in die Dünndarmschlinge. Die Dünndarmschlinge wurde beiderseits mit Darmklemmen vorsichtig abgeklemmt, so daß die Resorption auf einen Abschnitt von 40—50 cm beschränkt blieb. Reponierung des Darms in die Leibeshöhle und provisorischer Verschluß der Bauchdecken. Entnahme von je 10 cm³ Blut nach etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120 min. Nicht bei allen Tieren wurde zu jedem der genannten Zeitpunkte Blut entnommen, um den Blutverlust niedrig zu halten. In einigen Fällen wurde auch das zuströmende arterielle Blut gleichzeitig mit dem Mesenterialvenen- und Lebervenenblut entnommen. Nach Resorption des Aminosäuregemisches, die etwa 1—1½ Std in Anspruch nahm, Verschluß der Bauchdecken. Aufbereitung der Blutproben zur papierchromatographischen Aminosäurenbestimmung: scharfes Zentrifugieren, 4—5 cm³ Plasma werden mit 1 cm³

Trichloressigsäure gefällt. Die Ausgangsmenge Plasma war bei jedem Hund für alle Entnahmen genau gleich. Nach scharfem Zentrifugieren Nachfällen des Überstehenden mit 0,2 cm^3 Trichloressigsäure. Lange zentrifugieren. Überstehende eiweißfreie Flüssigkeit abmessen und auf einem Uhrglas an der Luft eintrocknen lassen. Rückstand in einem Sechstel des Ausgangsvolumens vor dem Trocknen destillierten Wassers aufnehmen. Ein Zehntel dieser Menge unter der Infrarotlampe auf 8 cm breite, 50 cm lange Filterpapierstreifen (Schleicher und Schüll Nr. 2043 b) mit der Mikropipette strichförmig in einer Breite von 6 cm auftragen. Je ein Streifen wurde in folgenden Lösungsmitteln chromatographiert: Methyläthylketon (70%) — Pyridin (15%) — Wasser (15%) und Phenol (80%) — Wasser (20%). Nach 20—24 Std (Methyläthylketon) bzw. 36 Std (Phenol-Wasser) trocknen für 24 Std an der freien Luft mit Ventilator im Abzug. Nach dem Trocknen werden die Streifen durch 1%ige Ninhydrinlösung gezogen und im Trockenschrank 30 min bei 80° C entwickelt. Mit den Hundeplasmen wird gleichzeitig ein Aminosäuregemisch aus 23 reinen Aminosäuren als Test für die Güte der Analyse und für die Festlegung der R_f-Werte für die einzelnen Aminosäuren, in beiden Lösungsmitteln mituntersucht. Es werden nicht alle 23 Aminosäuren in einem Gemisch untersucht, sondern auf einem Streifen werden in 1 cm Breite folgende Gemische nebeneinander aufgetragen. 1. Ornithin-Glutaminsäure-Alanin-Methionin-Leucin. 2. Cystin-Arginin-Valin-Phenylalanin-Prolin. 3. Cystein-Histidin-Tyrosin-Norleucin. 4. Lysin-Serin-Threonin-Norvalin-Isoleucin. 5. Asparaginsäure-Glykokoll-Oxyprolin. Die Lösungen waren 0,1%ig. 24 Std nach Entwicklung und Lagern im Dunkeln Messung der relativen Lichtabsorption: von einem Kymographenmotor wird ein zwischen 2 Glasplatten gelagerter Chromatographiestreifen langsam zwischen einer Lichtquelle und einer spaltförmigen Selen-Photozelle durchgezogen. Der Photostrom wird auf ein Galvanometer übertragen, dessen Ausschläge fortlaufend auf den in dem Kymographen laufenden Film aufgezeichnet werden. Auf diese Weise gewinnt man eine Absorptionskurve des gesamten Streifens. Die einzelnen Abschnitte der Kurven werden zu Gaußkurven ausgezogen und planimetriert. Berechnet wird lediglich der Flächenanteil des einer Aminosäure zugehörenden Gipfels an der Gesamtfläche aller sich als einzelne Gipfel darstellenden Aminosäuren. Diese Gesamtfläche wird = 100 gesetzt. Die Komplexe der sich nicht auftrennenden Aminosäure werden nicht berücksichtigt. Auf diese Weise lassen sich folgende Aminosäuren bestimmen (in der Reihenfolge der R_f-Werte): Phenol: Asparaginsäure — Ornithin-Glutaminsäure, Serin, Glykokoll, Threonin, Oxyprolin, Lysin, Alanin, Tyrosin, Arginin, Histidin. Methyläthylketon: Lysin-Ornithin, Cystin-Cystein, Glutaminsäure, Asparaginsäure-Arginin, Glykokoll, Serin, Alanin, Threonin, Valin, Methionin, Leucin-Norleucin-Isoleucin-Phenylalanin-Tryptophan.

Mit dieser Methode werden keine absoluten Aminosäurewerte gewonnen. Die Bestimmung absoluter Aminosäurenkonzentration mit Hilfe der Papierchromatographie ist mit einer großen Fehlerbreite behaftet, die vor allem durch eine von Tag zu Tag wechselnde Intensität der Ninhydrinfärbung bedingt ist. Deswegen beschränkten wir uns nur auf relative Werte, berücksichtigten nicht den unterschiedlichen Farbcharakter der einzelnen Aminosäuren und maßen photometrisch nur Absorptionen. Die Chromatogramme eines Versuchs, die miteinander verglichen werden sollten, wurden in einem Versuchsgang am gleichen Tage unter völlig gleichen Bedingungen entwickelt. Von jedem Ansatz wurden 3 Doppelbestimmungen gemacht. Die Fehlerbreite beträgt im Mittel für alle Aminosäuren dann $\pm$ 7,22%, sie schwankt zwischen $\pm$ 3,6 und $\pm$ 9,3% für die einzelnen Aminosäuren. Der Ausgangswert bei jedem Versuch wurde = 100 gesetzt und die relative Veränderung jeder einzelnen Aminosäure gegenüber dem Ausgangspunkt in Prozenten des Ausgangswertes angegeben.

Ergebnisse

Das für die Versuche verwandte Aminosäuregemisch hatte folgende prozentuale Zusammensetzung der quantitativ erfaßbaren Aminosäuren:

Lysin-Ornithin . .	6,8	Threonin	6,4
Cystin-Cystein . .	3,1	Valin	12,8
Glutaminsäure . .	9,1	Methionin	6,9
Asparaginsäure-		Leucin-Norleucin-	
Arginin	9,8	Phenylalanin-Try-	
Glykokoll.	5,2	tophan	12,4
Serin.	7,0	Isoleucin-Tyrosin .	9,6
Alanin	8,1	Prolin	2,8

Die Resorption der Aminosäuren beginnt unmittelbar nach ihrer Eingabe in den Darm. Nach spätestens 5 min lassen sich alle im Gemisch befindlichen Aminosäuren im Blut des von der Schlinge abführenden Mesenterialvenenastes in einer Konzentration nachweisen, die über der Ausgangskonzentration liegt. Die einzelnen Aminosäuren steigen im Mesenterialvenenblut zunächst etwa gleichmäßig, jedoch quantitativ unterschiedlich an (Abb. 6). Die Resorptionsgröße, über die man eine relative Aussage machen kann, wenn man die Integrale der Resorptionskurven miteinander vergleicht, steht in keiner festen Beziehung zur Konzentration im Darminhalt. Am deutlichsten ist das beim Vergleich von Glutaminsäure und Prolin, die trotz eines starken Konzentrationsunterschiedes im Aminosäuregemisch etwa die gleiche Resorptionsgröße haben (Abb. 3). In gewissen Grenzen hängt aber die Resorptionsgröße von der Konzentration im Darminhalt ab, was vor allem bei den höher konzentrierten Komplexen

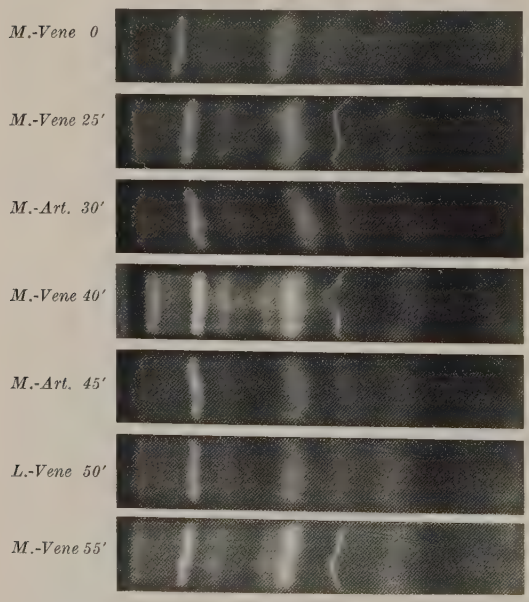


Abb. 1. Aminosäurekonzentration in Mesenterialvene, Mesenterialarterie und Lebervene während der Aminosäureresorption. Lösungsmittel: Methyl-Äthyl-Keton

mehrerer Aminosäuren deutlich wird (Abb. 4 und 5). Die Asparaginsäure hat eine auffallend niedrige Resorptionsgröße. Der Resorptionsvorgang verläuft offenbar nicht für alle Aminosäuren gleichmäßig. Vergleicht man die Mittelwerte aller Versuche miteinander (Abb. 3—5), so fällt ein periodischer Verlauf der Resorption auf. Während der Versuchsperiode von etwa 2 Std kann man 3 Resorptionsmaxima beobachten. Das erste liegt in der ersten $^1/_4$ Std, das zweite bei etwa 35—40 min, das

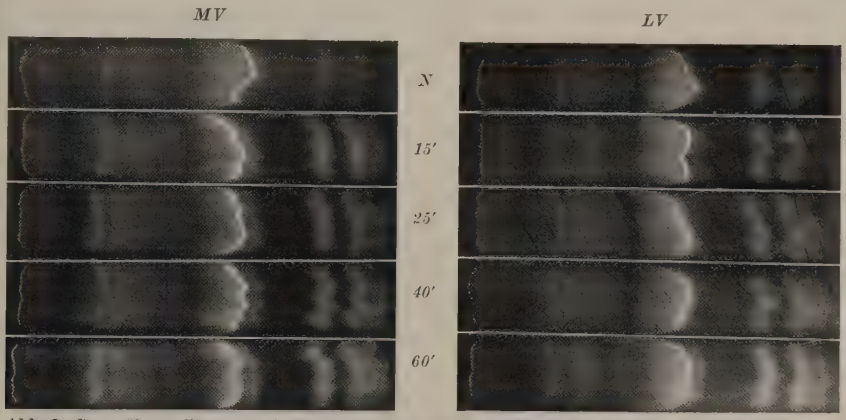


Abb. 2. Gegenüberstellung der Aminosäurekonzentration im Blut der Mesenterial- und Lebervene während der Aminosäureresorption. Lösungsmittel: Phenol

dritte bei etwa 1 Std. An dieser Periodik sind die einzelnen Aminosäuren unabhängig von ihrer Konzentration quantitativ unterschiedlich stark beteiligt, ohne daß sich hinsichtlich dieser Beteiligung eine Systematik erkennen läßt.

Im Lebervenenblut steigt die Aminosäurekonzentration zunächst nicht an (Abb. 1, 2). Entsprechend zeigt der Aminosäurespiegel des Mesenterialarterienblutes auch bei den Tieren, denen keine Fremdblutinfusion in die Femoral- oder Mesenterialvene gemacht wurde, keinen Anstieg. Das der Darmschlinge, in der die Resorption stattfindet, zuströmende Blut behält also über die Dauer des Versuches die Ausgangskonzentration an Aminosäuren bei.

Die Analyse der Einzeltiere zeigt jedoch, daß auch im Lebervenenblut einzelne Aminosäuren allmählich ansteigen. Dieser Anstieg steht in keinem quantitativen Verhältnis zur Konzentration der betreffenden Aminosäuren im Mesenterialvenenblut, wie ein Vergleich der Flächen zwischen den beiden Kurven in Abb. 6 lehrt. Das zeitliche und quantitative Auftreten resorbierter Aminosäuren im Lebervenenblut ist für die einzelnen Aminosäuren unterschiedlich. Eine Regel ließ sich dafür nicht aufstellen.

Läßt man das gleiche Aminosäuregemisch aus einem Cellophanschlauch in Sterofundin diffundieren, so ist der Konzentrationsanstieg in der Umgebungsflüssigkeit so, wie man ihn bei einer rein physikalischen Diffusion erwarten muß (Abb. 7).

Besprechung der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse geben einige Hinweise dafür, daß der Übertritt von Aminosäuren aus dem Darmlumen in das Mesenterialvenenblut kein rein physikalischer Vorgang der Diffusion oder Permeation ist, sondern daß es sich um eine physiologische Leistung der Darmwand, eine echte Resorption handelt. Im einzelnen sprechen folgende Befunde dafür: es besteht keine Beziehung der Resorptions-Geschwindigkeit und -größe zur Molekülgröße der einzelnen Aminosäuren. Das zeigt deutlich der fast gleiche Resorptionsmodus von Methionin und Glykokoll, sowie von Lysin und Serin. Die Ausgangskonzentration der einzelnen Aminosäure im Darminhalt hat auf ihre Resorption keinen entscheidenden Einfluß. Obwohl die Konzentration des Valin im Darmlumen doppelt so hoch lag, wie die des Threonin und obgleich beide etwa die gleiche Molekülgröße haben, ist ihre Resorptionsgeschwindigkeit und -größe etwa gleich (Abb. 6). Mithin haben gleiches Konzentrationsgefälle zwischen Darminhalt und Pfortaderblut sowie ähnliche Molekülgröße nicht den gleichen Resorptionsmodus notwendig zur Folge.

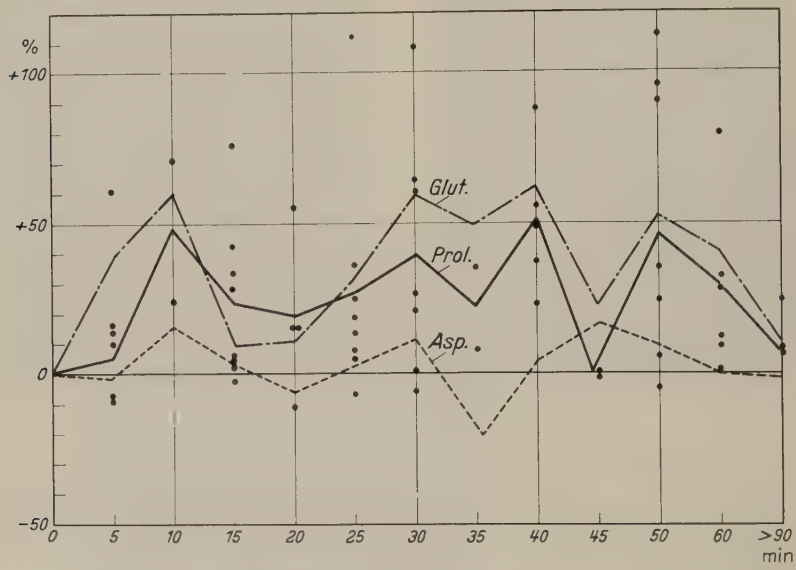


Abb. 3. Mittelwertskurven von 16 Hunden für die Aminosäuren, Glutaminsäure, Prolin und Asparaginsäure während der Aminosäureresorption aus dem Darm. Für das Prolin sind auch die Einzelwerte angegeben

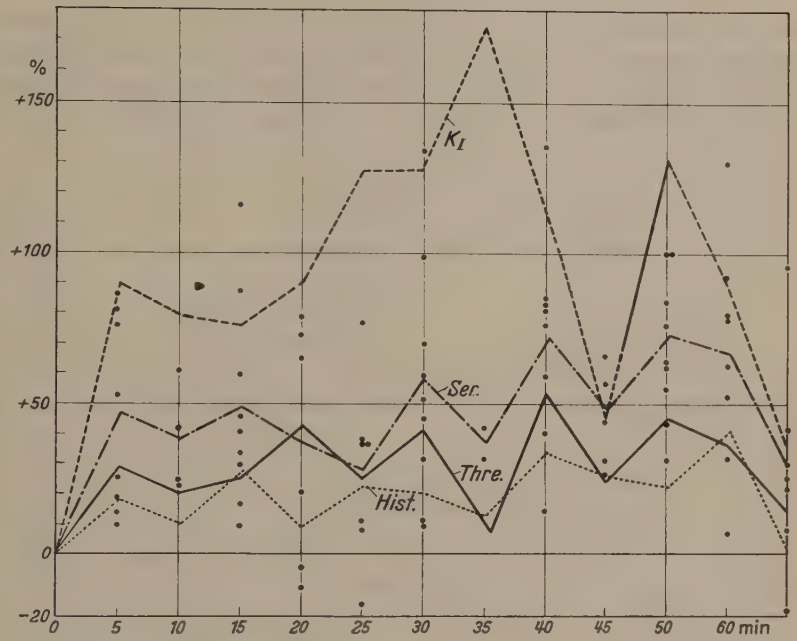


Abb. 4. Resorptionsverlauf der Aminosäuren Serin, Threonin und Histidin im Mesenterialvenenblut während der Aminosäureresorption. K_I umfaßt den Komplex Methionin-Valin-Norvalin-Tryptophan. Für Threonin sind auch die Einzelwerte eingezeichnet

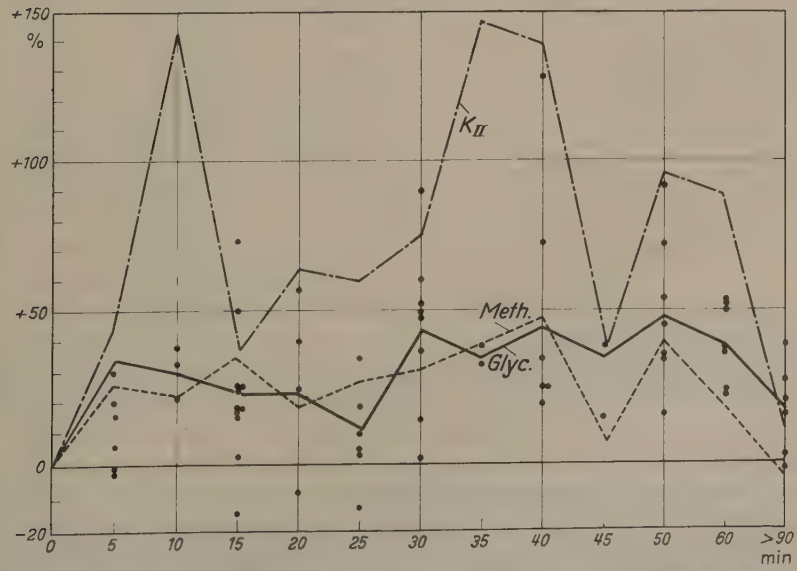


Abb. 5. Mittlerer Verlauf der Glykokoll- und Methionin-Konzentration im Mesenterialvenenblut während der Resorption von Aminosäuren aus dem Darm. Für Glykokoll sind die Einzelwerte angegeben. K_{II} umfaßt die Aminosäuren Phenylalanin, Isoleucin, Leucin, Norleucin

Erst bei sehr hohen Konzentrationen von Aminosäuren im Darmlumen sind Resorptionsgröße und -geschwindigkeit auch hoch. Im Gegensatz zu den Befunden von Chase und Lewis an der Ratte war in unseren Versuchen die Resorptionsgröße von Glykokoll, Glutaminsäure und

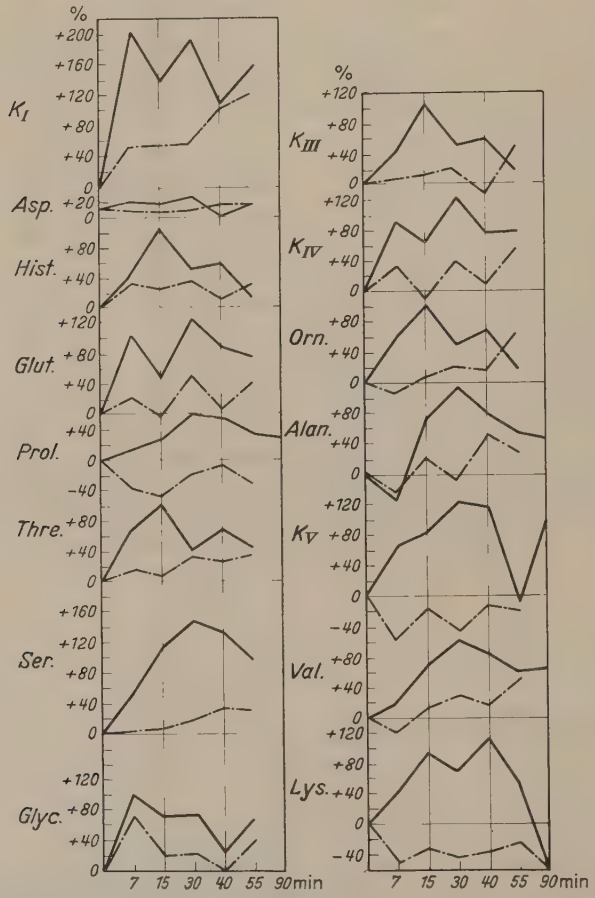


Abb. 6. Vergleich der Aminosäurekonzentrationen im Mesenterialvenen- und Lebervenenblut während Aminosäureresorption bei einem Hund. K_I umfaßt die Aminosäuren Methionin, Valin, Norvalin, Tryptophan, K_{III} Arginin und Tyrosin, K_{IV} Lysin und Alanin, K_V Methionin, Tryptophan, Phenylalnin, Isoleucin, Leucin Norleucin

Methionin etwa gleich, während diese Autoren eine Resorption von 0,84 bzw. 0,41 bzw. 0,36 mmg Äquivalent/100 g Ratte/Std fanden. Eine quantitative Beziehung der Resorption zur Diffusionskonstanten läßt sich aus den hier vorgelegten Daten nicht ablesen. Schließlich spricht der Resorptionsmodus selbst für einen biologischen und gegen einen rein physikalischen Vorgang. Die Konzentration der Aminosäuren steigt

zunächst steil an, d. h. die pro Zeiteinheit übergetretene Menge an Aminosäure nimmt — eine gleichbleibende Durchblutung der Darmschlinge vorausgesetzt —, pro Zeiteinheit zu. Da in der gleichen Zeit die Aminosäurenkonzentration im zuströmenden Arterienblut bei den verschiedenen Versuchsanordnungen gleich blieb, kann es sich also nicht um ein „Aufschaukeln", eine Superposition der resorbierten Aminosäuren auf einen stetig ansteigenden Aminosäuregehalt des Arterienblutes, sondern nur um eine Beschleunigung der Resorption selbst handeln. Mit abnehmendem Darminhalt geht dieser Vorgang weder stetig weiter, noch nimmt er von einem gewissen Zeitpunkt an stetig ab, wie man es bei einer reinen Diffusion erwarten müßte. Vielmehr ergibt sich das Bild einer deutlichen Periodik. Das Gemisch ist etwa in $1^1/_2$—2 Std aus der Darmschlinge resorbiert. In dieser Zeit läßt die Resorptionskurve 3 deutliche Maxima des Aminosäurengehaltes im Mesenterialvenenblut erkennen. Der Grund zu dieser Periodik ist nicht erkennbar. Man müßte zunächst an eine Spontanrhythmik der Darmdurchblutung denken. Dagegen spricht, daß nicht alle Aminosäuren quantitativ gleich von diesem Vorgang betroffen sind. Es ist deswegen naheliegender an eine Periodik des Resorptionsvorganges selbst zu denken. Zusammengenommen sprechen die vorgelegten Befunde für eine Aminosäurenaufnahme durch die Darmwand in Form einer, auch für die einzelnen Aminosäuren selektiven Resorption.

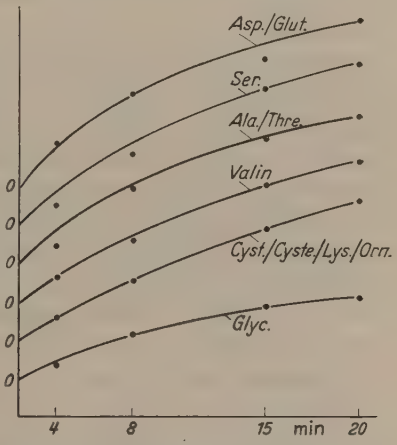


Abb. 7. Diffusion eines Aminosäuregemisches aus einem Cellophanschlauch in Sterofundin als Umgebungsflüssigkeit. Der Anstieg der Konzentration in der Außenflüssigkeit ist papierchromatographisch gemessen. Er ist in cm^2-Fläche des Photogramms aufgetragen

Die durch die Pfortader der Leber zuströmenden resorbierten Aminosäuren sind zunächst nach der Leberpassage des Pfortaderblutes in der Lebervene mit der hier verwandten, sehr empfindlichen chromatographischen Methode nicht nachweisbar.

Auch Abel erhielt aus dem Pfortaderblut während der Eiweißverdauung mehr Aminosäuren als aus dem Blut der Arteria carotis, wenn er in die Gefäße Dialysierschläuche einschaltete und die herausdiffundierenden Aminosäuren bestimmte. Die Erklärung dafür müßte man zunächst in der bei den Versuchen Abels erfolgenden Verdünnung des Pfortaderblutes durch das Blut der Arteria hepatica und das gesamte Körpervenenblut im rechten Ventrikel, bei unseren Versuchen in dem Zustrom des Blutes der übrigen Pfortaderäste und des Blutes der Arteria hepatica zu dem aus der Versuchsdarmschlinge abströmenden Mesenterialvenenblut

suchen. Jedoch sollte man, wenn es sich lediglich um einen Verdünnungseffekt handelt, einen allmählichen zeitlich für alle Aminosäuren gleichen, der Konzentration der einzelnen Aminosäuren im Mesenterialvenenblut der Darmschlinge gemäßen Anstieg der Konzentration im Lebervenenblut finden. Das ist nicht der Fall.

Der Zeitpunkt des Erscheinens der einzelnen Aminosäuren im Lebervenenblut ist verschieden und nicht konstant. Er ist ebenso wie die Höhe des Anstiegs nicht abhängig von der Konzentration der Aminosäure im Pfortaderblut. Vielmehr muß man die Befunde als einen Auffangmechanismus deuten. Abfangen und Abgeben der Aminosäure aus der Pfortader und in die Lebervene geschieht jedoch nicht in einem Rhythmus wie beim Wasser. Wir möchten aus den Ergebnissen schließen, daß die Leber die ihr zuströmenden Aminosäuren im Gegensatz zu den Peptiden und Polypeptiden zunächst abfängt. Ob sie diese dann nur speichert oder gleich verbrennt oder zu Serumeiweiß synthetisiert, muß in einer anderen Versuchsanordnung geprüft werden. Wir möchten aber unter Berücksichtigung der Arbeiten von Miller[9] über den Einbau von C^{14}-Lysin in die Serumeiweiße bei Leberperfusion eine bevorzugte Verwendung der Aminosäuren für die Eiweißsynthese annehmen. Ob die Leber nach einiger Zeit die Aminosäuren durchläßt, die sie für die Eiweißsynthese nicht braucht, ist eine bisher unbewiesene Vermutung. Für die Annahme einer Verwendung der mit der Pfortader antransportierten Aminosäuren in der Leber spricht der Befund einer starken Aminosäureausscheidung im Urin nach Hepatectomie sowie die Aminoacidurie und -ämie bei schweren Leberschäden. In diesen Fällen fällt die Leber für eine Verwertung der in die Pfortader resorbierten Aminosäuren ganz oder teilweise aus. Die im Laufe eines massiven Zustromes, wie in den vorliegenden Versuchen, die Leber schließlich doch passierenden geringen Mengen von Aminosäuren werden entweder von anderen Geweben abgefangen oder so stark verdünnt, daß das dem Darm zuströmende Mesenterialarterienblut seinen Aminosäurespiegel im Verlauf der Eiweißverdauung und Aminosäurenresorption nicht ändert.

Zusammenfassung

1. An 16 Hunden werden nach Eingabe von 50 g Aminosäuren in eine Dünndarmschlinge papierchromatographisch die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren im abströmenden Mesenterialvenenblut, in den Lebervenen und im Mesenterialarterienblut gemessen.

2. Die Resorption der einzelnen Aminosäure erfolgt periodisch. Sie ist von Molekülgröße, Diffusionskonstante und Konzentrationsgefälle Darminhalt-Pfortaderblut unabhängig. Sie ist also kein passiv-physikalischer Vorgang, sondern eine aktive Leistung der Darmwand.

3. Die der Leber mit dem Pfortaderblut zuströmenden Aminosäuren werden von ihr abgefangen, und zwar selektiv. Einige verlassen die Leber

zeitlich und mengenmäßig verschieden in geringer Konzentration. Der Vorgang wird als Funktion der Leber, die die abgefangenen Aminosäuren entweder verbrennt oder zu Peptiden synthetisiert, und nicht als Verdünnungseffekt durch Leberarterienblut gedeutet.

4. Die Aminosäurekonzentration des dem Darm zuströmenden Arterienblutes ändert sich während der Versuchsdauer von 120 min, während der die Aminosäure vollständig aus dem Darm resorbiert sind, nicht.

Literatur

[1] Abel, S. J.: Science (Lancaster, Pa.) **42**, 135 (1915). — [2] Chase, B. W., and H. B. Lewis: J. of Biol. Chem. **106**, 315 (1934). — [3] Dent, C. E., and J. A. Schilling: Biochemic. J. **44**, 318 (1949). — [4] Hartmann, F., u. K. Kellerhof: Klin. Wschr. — [5] Höber, R.: Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe. Bern 1947. — [6] Höber, R., u. J. Höber: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **34**, 486 (1936). — [7] Höber, R., and J. Höber: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **10**, 401 (1937). — [8] Laszt, L.: Pflügers Arch. **240**, 636 (1938). — [9] Miller, L. L., C. G. Bly, M. L. Watson and W. F. Bale: J. of Exper. Med. **94**, 431 (1951). — [10] Northup, D. W., and E. J. van Liere: Amer. J. Physiol. **134**, 288 (1941). — [11] Polson, A.: Biochemic. J. **31**, 1903 (1937). — [12] Schmengler, F.: Pflügers Arch. **232**, 591 (1933). — [13] van Slyke, D. R., and G. M. Meyer: J. of Biol. Chem. **16**, 197, 231 (1913/14). — [14] Strack, E.: Die Biochemie der Resorption in Flaschenträger, B., u. E. Lehnartz: Physiologische Chemie II, a 227 (1954).

Prof. Dr. F. Hartmann, Göttingen, Med. Univ.- u. Poliklinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 414—420 (1956)

Aus der Medizinischen Universitäts- und Poliklinik Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. R. Schoen)

Über die Serumeiweißfraktionen des Pfortader- und Lebervenenblutes während der Resorption eines Aminosäuregemisches aus dem Darm

Von
F. Hartmann, H. Lenz, C. Lopez-Calleja und H. Münzenberg

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. November 1955)

Während jede Zelle ihr eigenes Eiweiß sowohl aus den im Blute kreisenden Aminosäuren, wie auch direkt aus den Plasmaeiweißkörpern aufbauen kann[14], ist die Bildung der Plasmaeiweißkörper nur bestimmten Zellsystemen vorbehalten. Die Leber ist das Zentralorgan, das im Durchströmungsversuch mit C^{14}-Lysin das gesamte Albumin und Fibrinogen, sowie 80% der Globuline aufbaut[16]. Am hepatectomierten Hund sinkt die Albuminsynthese auf ein Zwanzigstel, die Globulinsynthese auf ein Siebentel, ab[20]. Es muß also auch außerhalb der Leber eine Plasmaeiweißsynthese möglich sein.

Maurer u. Müller[13] weisen auf die Möglichkeit der Bildung von Albuminen aus Globulinen hin. Eine Reihe von Untersuchungen spricht dafür, daß die Serumeiweißfraktionen aus identischen niedrig-molekularen Polypeptiden aufgebaut sind, die zwischen den einzelnen Fraktionen austauschbar sind[7]. Als extra-hepatische Bildungsstätten von Globulinen, insbesondere Gammaglobulinen, die von der Leber nicht synthetisiert werden können[16], sind vor allem das RES[8], das Knochenmark[12] und in ihm wegen der häufigen Gleichzeitigkeit von Dysproteinämie und Plasmazellvermehrung bei Plasmozytom, Nephrose, Leberzirrhose und rheumatischer Arthritis vor allem die Plasmazellen[5, 19, 21] angesprochen worden. In der Gewebskultur geben junge Lymphocyten und Plasmazellen Beta- und Gamma-Globulinantikörper ab[10]. Durchströmungsversuche von Miller mit C^{14}-Lysin an der leberlosen unteren Hälfte der Ratte haben gezeigt, daß der größte Teil der C^{14}-Aktivität sich im Gammaglobulin, ein geringerer im Alpha- und Betaglobulin, nichts in den Albuminen und im Fibrinogen findet[17]. Es ist ganz natürlich, daß sich das Augenmerk vor allem auf die Schleimhaut des Dünndarms richtet, in der sich Zellen des lymphocytären, plasmazellulären und reticuloendothelialen Systems in einer im übrigen Körper nicht mehr anzutreffenden Massierung finden.

Für die Dünndarmschleimhaut als mögliche Bildungsstätte für die Serumglobuline sprechen folgende Befunde: nach peroraler und intravenöser Gabe isotopenmarkierten Eiweißes findet man in der Darmschleimhaut die höchste Organeiweißaktivität[12]. Nach intravenöser Gabe von S^{35}-Methionin wird das Maximum nach 16 Std beobachtet. Die Aktivität des Darmschleimhauteiweißes beträgt das Doppelte der Plasmaeiweißaktivität[20]. Da die Einbaugröße der Darmschleimhaut

für S^{35}-Methionin nach Herausnahme der Leber nicht abnimmt, sondern sogar stark ansteigt, muß man schließen, daß die Darmschleimhaut nicht an anderer Stelle gebildetes Eiweiß speichert, sondern selbst Eiweiß synthetisiert. Die Einbaugröße ist 2—3mal höher als die in Leber, Milz, Niere, Lymphknoten und Serumeiweißkörpern. Der Einbau beginnt schon innerhalb weniger Minuten. Es ist unwahrscheinlich, daß die Darmschleimhaut das S^{35}-Methionin nur zum Aufbau eigenen Zelleiweißes in dieser Menge an sich reißt. Vielmehr ist es berechtigt, an eine Globulinsynthese zu denken, zumal die Aktivität der Serumglobuline schneller ansteigt als die der Albumine, und die Aktivität der Darmschleimhaut schneller als

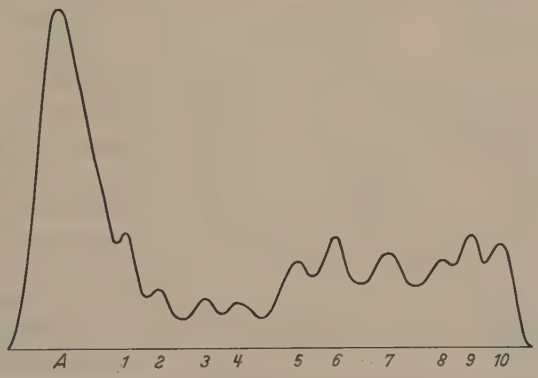


Abb. 1. Elektrophoresediagramm aus dem Plasma des Mesenterialvenenblutes eines Hundes

die der Leber. Der Beweis für diese zu vermutende Globulinsynthese in der Dünndarmschleimhaut konnte bisher jedoch nicht erbracht werden.

Die folgenden Untersuchungen hatten das Ziel, die Serumeiweißkörper des Hundes im Pfortaderblut und in der Lebervene während der Resorption von 50 g eines Aminosäuregemisches zu untersuchen. Die Versuchsanordnung ist bereits in der vorhergehenden Mitteilung geschildert. Die Bestimmung der Serumeiweißkörper wurde refraktometrisch und mikroelektrophoretisch nach ANTWEILER durchgeführt. Zur Charakterisierung der einzelnen Serumeiweißfraktionen wurden außerdem papierelektrophoretische Untersuchungen durchgeführt, da sich die Serumeiweißkörper des Hundes nicht wie beim Menschen einfach in Albumine, Alpha-, Beta- und Gammaglobuline aufteilen lassen. Es mußten deswegen zunächst die relativen Wanderungsgeschwindigkeiten der zehn Globulinfraktionen des Hundes und deren Normalwerte ermittelt werden.

Ergebnisse

Die Abb. 1 zeigt zunächst ein Elektrophoresediagramm des Pfortaderblutes eines gesunden Hundes. Sie macht deutlich, daß das Hundeplasma mehr Globulinfraktionen aufweist als das des Menschen. Diese weisen gegenüber dem Menschen auch andere relative Wanderungsgeschwindigkeiten auf. Ein Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeiten

Tabelle 1

Hund	Mensch		Relative Wanderungsgeschwindigkeiten					Absol. Normalwerte %				Normalwerte Hund g% Mesent.-Vene	
			Hund			Mensch		Mensch Venenblut	Venenblut Hund				
			Frei	Stärke	Papier	Frei	Papier		nach Moore[10]	nach Lewis[11]	nach Deutsch[3]		
Alb	Alb							63,6 ± 6,5	50 ± 5	43,6 ± 1,23	39 ± 2,1	3,35	= 46%
1	Glob.		1,4	0,9	1,1							0,53	
								6,0 ± 2,5			16,9 ± 0,3		
2		α_1	2,4	2,3	2,4					9,9 ± 0,48		0,30	= 21,3%
									10 ± 4				
3			3,3	3,4	3,6	1,87	1,1			9,2 ± 0,63		0,42	
								5,8 ± 2,5			8,0 ± 0,6		
4		α_2	4,2	4,3	4,4	3,67	2,4			14,3 ± 0,46		0,35	
5			5,2	5,2	5,5				16 ± 5		13,0 ± 0,16	0,33	= 23 6%
6			6,1	6,2	6,2	6,47	4,3	13,1 ± 3,4		14,5 ± 0,6		0,70	
7		β	7,1	7,1	7,0		5,3		10 ± 7		13,3 ± 0,3	0,74	
8			8,1	8,0	8,2							0,45	
9		γ	9,0	8,8	9,1	10,0	10,0	11,5 ± 5,2	14 ± 3	8,8 ± 0,58	9,3 ± 0,6	0,36	= 9,1%
10			10,0	10,0	10,0							0,31	

zeigt, daß man die Globuline des Hundes 1—4 analog zur Nomenklatur, die sich beim menschlichen Plasmaeiweiß bewährt hat, als Alpha, die Fraktionen 5—7 als Beta und die Fraktionen 8—10 als Gamma bezeichnen kann. Die Tab. 1 gibt eine Übersicht über Wanderungsgeschwindigkeiten und Normalwerte. Zur Ausgangsbasis der Berechnung der relativen Wanderungsgeschwindigkeiten wurde der Abstand des Albumin- zum letzten Gammaglobulingipfel genommen. Die Berechnung erfolgte nach der Formel: $\frac{R}{W} \times 10$ (W = Abstand Albumin → γ 3, R = Albumin → Globulin x).

In Abb. 2 sind die Mittelwerte der Serumeiweißfraktionen und des Gesamtserumeiweißes im Verlauf aller 16 Versuche zusammengefaßt. Die mittleren Schwankungen sind gering und lassen bei der großen Streubreite der Einzelwerte eine statistische Aussage nicht zu. Der Gesamteiweißgehalt zeigt nach den ersten 20 min eine fallende Tendenz, weist aber nach etwa 1 Std einen deutlichen Gipfel

auf. Diese 2-Gipfligkeit der Kurve läßt sich auch bei den Albuminen sowie bei α 1, α 2 und α 3 erkennen. Bei den Betafraktionen liegen nur die Werte von β 1 dauernd über den Ausgangswerten. Von den Gammaglobulinen weisen γ 2 und γ 3 eine Tendenz zur Erhöhung und 2-Gipfligkeit auf.

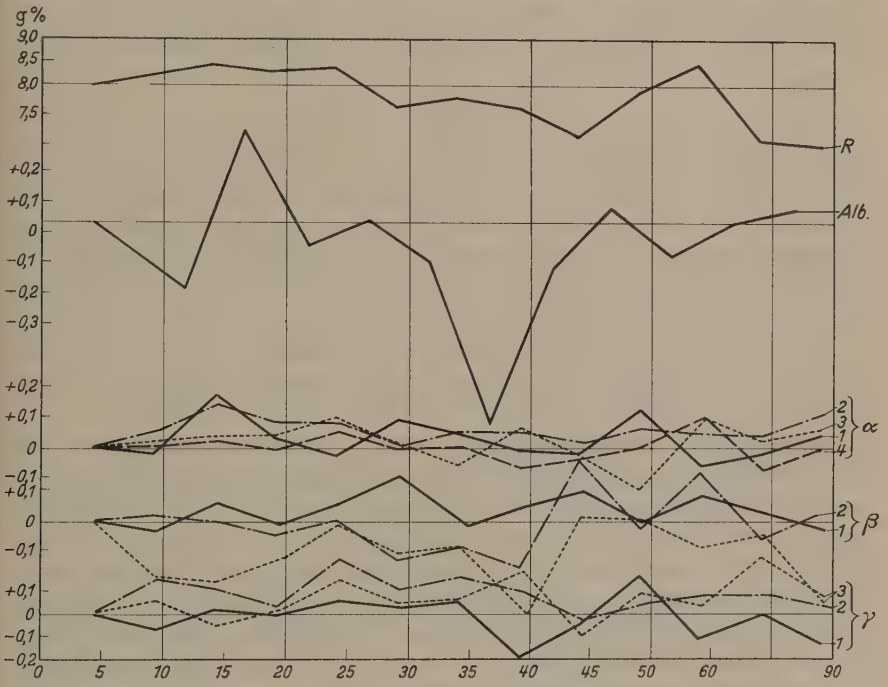


Abb. 2. Mittelwertskurven von 16 Hunden für Gesamtplasmaeiweiß (R). Albumine (Alb.) und die Globulinfraktionen während der Resorption von Aminosäuren aus dem Darm

Die Vergleiche zwischen Gesamtserumeiweißgehalt und absolutem Gehalt der einzelnen Eiweißfraktionen im Pfortader- und Lebervenenblut zeigen weder beim nüchternen Tier noch in der Phase der Aminosäureresorption charakteristische Unterschiede.

Das Pfortaderblut ist nicht sicher globulinreicher als das Venenblut und wird bei der Leberpassage nicht albuminreicher. Am nüchternen Tier unterscheidet sich auch der onkotische Druck im Blut der Lebervene und der Pfortader nicht, wie die folgende Tab. 2 zeigt.

Tabelle 2
Onkotischer Druck Millimeter H_2O

Hund	V. portae	V. hepatica
1	348	324
2	274	288
3	225	218
4	325	325
5	203	203
6	318	312
7	279	279
8	253	258

Besprechung der Ergebnisse

Obwohl die starke Anreicherung peroral und intravenös gegebenen S^{35}-Methionins in der Mucosa des Dünndarms, das schnelle Erscheinen markierter Globuline im Serum und die Globulinbildung in der unteren Körperhälfte der leberlosen Ratte für eine Globulinsynthese in der Darmwand sprechen, konnte eine solche bisher nicht erwiesen werden.

Auch Ewerbeck[4], der das Pfortaderblut des Hundes reicher an Globulinen fand als das Venenblut, nahm einen Abbau von Pfortaderglobulinen in der Leber zugunsten einer Albuminsynthese an und schloß aus seinen Versuchen, daß die Leber laufend Albumine an das Blut abgibt. Er denkt an eine Speicher- oder Reservefunktion der Leber. Daß diese im Dienste der Onkoregulation nicht besteht, konnten Görtz u. Hartmann[6] zeigen. In den vorliegenden Versuchen lassen sich charakteristische Unterschiede zwischen Pfortader- und Lebervenenblut im Rahmen der statistischen Schwankungen der Einzelwerte nicht nachweisen. Die Ergebnisse von Ewerbeck sind deswegen mit Zurückhaltung zu bewerten. Dort wurde Venenblut, d. h. nicht nur durch die Leber gegangenes und dort angeblich mit Albumin angereichertes, sondern außer durch das Blut der Leberarterie auch noch mit dem gesamten Venenblut im rechten Ventrikel vermischtes Blut untersucht.

Es erscheint uns nicht möglich, daß unter diesen Umständen ein Unterschied zwischen dem Venenblut der Peripherie und dem Blut des nicht mit Eiweißresorption beschäftigten Darmes besteht. Man müßte dann annehmen, daß die Darmwand Albumine in Globuline umwandelt. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit den von Ewerbeck mitgeteilten nicht überein. Vor allem die Gleichheit des onkotischen Drucks im Pfortader -und Lebervenenblut am nüchternen Tier scheint uns gegen einen systematischen Unterschied in der Eiweißzusammensetzung und im Eiweißgehalt des Blutes vor und nach Leberpassage zu sprechen.

Die Auswertung der Serumeiweißbefunde im Pfortaderblut während der Aminosäureresorption zeigt, daß innerhalb der ersten halben Stunde eine Tendenz des Gesamtserumeiweißes, besonders der α- der β_1- und der γ_2-Fraktion zum Anstieg besteht. Statistisch läßt sich dieser Befund bei der Kleinheit der Schwankung und der großen Streuung der Einzelwerte nicht sichern. Wir können ihn deswegen auch nicht als einen Beweis für eine Eiweißbildung im Darm ansehen. Wenn sie besteht, was wir desungeachtet weiterhin vermuten, so ist die Methode der laufenden elektrophoretischen Kontrolle der Serumeiweißfraktionen in dem von der verdauenden Darmschlinge abführenden Ast der Pfortader zu grob, um die Synthese zweifelsfrei zu erweisen. Das Haupthindernis ist die, mit der Durchblutungsgröße verglichen, wahrscheinlich langsame Eiweißsynthese. Bei einem Hund von 10 kg Gewicht muß man mit einer Pfortaderdurchblutung von 200 cm^3 pro Minute rechnen. Nimmt man bei unserer Versuchsanordnung für die verdauende Schlinge nur eine

Durchblutung von 10 cm³ pro Minute an, was unseren Erfahrungen etwa entspricht, so würde eine Erhöhung einer Fraktion um 0,1 g-% schon eine Syntheseleistung der Darmschlinge von 10 mg dieser Fraktion in der Minute bedeuten. Sie würde bei unserer Versuchsanordnung von einer Darmschleimhaut der Oberfläche etwa 150—200 cm³ (ohne Berücksichtigung der Falten) vollbracht werden müssen. Vorausgesetzt, daß sich immer Aminosäuren im Darm befinden, würde das einer Tagesleistung von etwa 15 g Eiweiß nur dieser einen Fraktion und nur in dem genannten Darmabschnitt entsprechen. Da die tatsächliche Syntheseleistung sicher niedriger liegt, weil der größte Teil der Aminosäuren, wie die erste Mitteilung zeigt, in freier Form resorbiert werden, liegen die zu erwartenden Veränderungen im absoluten Gehalt der Eiweißfraktionen der Pfortader sicher innerhalb des methodischen Fehlers der Mikroelektrophorese, wenn man von biologischen Einflüssen wie z. B. Veränderungen des Wassergehaltes während des Versuches absehen will. Einen wichtigen Befund, der dennoch für eine Peptidsynthese aus Aminosäuren in der Darmwand spricht, hat Christensen[2], leider nur an einem Hund, beigesteuert. Nach Verfütterung von Glutaminsäure sah er einen Peptidanstieg im Pfortaderblut ähnlich wie bei Verfütterung von Casein oder Humanalbumin. Mit der papierchromatischen Methode haben wir keine Fraktion feststellen können, die man als Peptid hätte ansprechen müssen. Jedoch darf man diese negativen Befunde nicht gegen eine mögliche Eiweißsynthese in der Darmwand auswerten, sondern nur gegen die Eignung der Elektrophorese und der Papierchromatographie in der hier gewählten Versuchsanordnung zum Nachweis einer solchen Eiweißsynthese.

Zusammenfassung

1. An 16 Hunden werden während der Resorption eines Aminosäuregemisches aus dem Dünndarm die Eiweißfraktionen im Blut des abführenden Pfortaderastes und im Lebervenenblut untersucht.

2. Es werden die relativen Wanderungsgeschwindigkeiten und die Normalwerte der Hundeserumglobuline für die freie und die Papierelektrophorese mitgeteilt.

3. Systematische Unterschiede zwischen Pfortader- und Lebervenenblut finden sich weder bei den Eiweißfraktionen noch beim onkotischen Druck.

Literatur

[1] Boguth, W.: Naturwissenschaften **40**, 22 (1953). — [2] Christensen, H. N.: Biochemie J. **44**, 333 (1949). — [3] Deutsch, H. F.: J. of Biol. Chem. **161**, 1 (1945). — [4] Ewerbeck, H.: Z. exper. Med. **117**, 237 (1951). — [5] Fleischhacker, H.: Wien. Arch. inn. Med. **34**, 96 (1940). — [6] Görtz, H., u. F. Hartmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 67 (1951). — [7] Hartmann, F., C. López-Calleja u. G. Gattow: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **61**, 273 (1955). — [8] Heinlein, H.: Z. exper. Med. **112**,

535 (1943). — [9] Kenning, J. F., and L. B. van der Slikke: J. Labor. a. Clin. Med. **36**, 167 (1950). — [10] Lewis, L. A., L. H. Page and O. Gasser: Amer. J. Physiol. **161**, 101 (1950). — [11] Magnus-Levy, A.: Z. klin. Med. **119**, 307 (1932). — [12] Masters, R. E., G. H. Tischkoff and G. H. Whipple: J. of Exper. Med. **90**, 297 (1949). — [13] Maurer, W., u. E. R. Müller: Biochem. Z. **326**, 474 (1955). — [14] Miller, L. L. und Mitarb.: J. of exp. Med. **93**, 539 (1951). — [15] Miller, L. L., C. G. Bly, M. L. Watson and W. F. Bale: J. of Exper. Med. **94**, 431 (1951). — [16] Miller, L. L., C. G. Bly u. W. F. Bale: J. of Exper. Med. **99**, 133 (1954). — [17] Moore, W.: J. of Biol. Chem. **161**, 21 (1945). — [18] Rohr, K.: Helvet. med. Acta 5, Suppl. **3**, 544 (1938). — [19] Tarver, H., and W. O. Reinhardt: J. of Biol. Chem. **167**, 395 (1947). — [22] Tarver, H. and W. O. Reinhardt: J. of Biol. Chem. **167**, 401 (1947). — [21] Undritz, E.: Helvet. med. Acta **5**, 548 (1938).

Prof. Dr. F. Hartmann, Göttingen, Med. Univ.- u. Poliklinik

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 421—424 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Chemische Struktur und pharmakologische Wirkung atemhemmender Substanzen

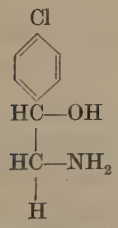
Von
MARTIN KRAMER

(Eingegangen am 11. Januar 1956)

Vor einiger Zeit berichteten HEUBNER u. VIESSMANN über eine Substanz, p-Chlorphenyläthanolamin, die bei intravenöser Injektion in Dosen von 1—2 mg/kg an Katzen, Kaninchen und Ratten einen reflektorischen Atemstillstand auslöste, der durch Vagotomie aufhebbar war. Durch eigene Untersuchungen wurden die den Reflex auslösenden sensiblen Receptoren im Ausbreitungsgebiet der A. pulmonalis lokalisiert. Da die Wirkung mehrerer atemhemmender Substanzen — benutzt wurde p-Chlorphenyläthanolamin, Phenyldiallylessigsäure-Diäthylaminoäthanolester und Veratrin — in verschiedener Weise pharmakologisch zu beeinflussen war, wurde die Möglichkeit des Vorhandenseins verschiedener Receptoren diskutiert.

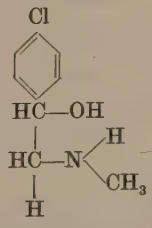
Bei der pharmakologischen Prüfung des p-Chlorphenyläthanol*methyl*amins, einer dem Sympatol analogen Substanz, ergaben sich Unterschiede in der Beeinflussung der Atmung im Vergleich zum p-Chlorphenyläthanolamin und zum Phenyläthanolamin, die Aussagen über Beziehungen der chemischen Struktur zur atemhemmenden Wirkung gestatten und deswegen einer kurzen Mitteilung wert erscheinen.

I



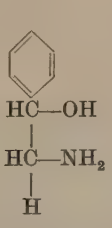
p-Chlorphenyl-äthanolamin

II



p-Chlorphenyläthanolmethylamin

III



Phenyläthanolamin („Apophedrin")

Pharmakologische Eigenschaften des p-Chlorphenyläthanolmethylamins

Die LD 50 betrug an Ratten bei intravenöser Applikation 75 mg/kg, bei Gabe in den Magen etwa das 20fache (1,5 g/kg). Die Substanz wird also offenbar unvollständig resorbiert. An narkotisierten Katzen und

Kaninchen traten nach intravenöser Injektion von 0,2—2,0 mg/kg vorübergehende Blutdrucksteigerungen bis 30 mm Hg auf. Höhere Dosen bewirkten Blutdrucksenkungen. Bei wiederholten Gaben trat ein Wirkungsverlust ein. Am isolierten Meerschweinchenherzen nach Langendorff bewirkte die Injektion von 5 γ der Substanz in die Durchströmungsflüssigkeit vorübergehend Tachykardie und eine Zunahme der Hubhöhe. Höhere Dosen hatten Reizleitungsstörungen und periodischen Herzstillstand zur Folge. Die am isolierten Kaninchenohr nach Krakow-Pissemski untersuchte gefäßverengernde Wirkung der Substanz war relativ stark und nur 5—10mal schwächer als die des Adrenalins. Auch hier fiel eine erhebliche Tachyphylaxie auf. Bei intakter Innervation konnten an der Katze keine oder nur sehr geringe Nickhautkontraktionen ausgelöst werden, nach Denervierung trat eine deutliche Wirkungsverstärkung auf.

Wirkung von p-Chlorphenyläthanolmethylamin, p-Chlorphenyläthanolamin und Phenyläthanolamin auf die Atmung

Die Versuche wurden an Katzen in Urethannarkose und an Kaninchen in Pernoctonnarkose durchgeführt. Die Atemexkursionen wurden mittels einer Mareyschen Kapsel registriert, die durch Nebenschluß an eine Trachealkanüle angeschlossen war. Mit p-Chlorphenyläthanolmethylamin konnte in Dosen bis 5 mg/kg intravenös (V. jugularis) weder an Katzen noch an Kaninchen ein Atemstillstand erzielt werden. Es trat nach hohen Dosen (4—5 mg/kg) für kurze Zeit lediglich eine geringe Verminderung der Atemfrequenz und der Größe der Atemexkursionen auf.

Der gleiche Befund wurde mit Phenyläthanolamin erhoben. Dosen bis 3 mg/kg verursachten eine leichte Atemdepression, die aber auf die erhebliche Blutdrucksteigerung (60 mm Hg und mehr) zurückzuführen war. In keinem Fall wurde ein Atemstillstand beobachtet. An denselben Tieren war p-Chlorphenyläthanolamin in bekannter Weise wirksam. Dosen von 2 und 3 mg/kg verursachten bei allen Tieren einen deutlichen Atemstillstand.

Diskussion

p-Chlorphenyläthanolamin (I) unterscheidet sich von der einen geprüften Substanz (II) nur durch eine freie Aminogruppe und von der anderen (III) durch die Chlor-Substitution in p-Stellung. Beides ist also offenbar für die Erregung der sensiblen Receptoren in der Lunge notwendig.

Dawes u. Mott haben bei der Untersuchung atemhemmender aromatischer Guanidine ähnliche Befunde erhoben. Dabei erwies sich Phenyldiguanid als sehr wirksam. Durch Chlor- oder Methylsubstitution in ortho-Stellung wurde die Wirkung verstärkt, weniger durch para-Chlor-Substitution. Phenylguanid war bedeutend weniger wirksam als Phenyl*di*guanid, p-Chlorphenylguanid war jedoch genau so wirksam wie Phenyldiguanid. Die para-Chlor-Substitution bewirkte also eine erhebliche Verstärkung. Eine ortho-Chlor-Substitution führte dagegen zu einer

Wirkungsverminderung. Durch Substitution der Endaminogruppe mit einem oder zwei Methylradikalen oder anderen Paraffinresten wurden alle Phenylguanidine und -diguanidine unwirksam. Zusammen mit Fastier untersuchte Dawes ferner eine große Zahl verschiedener Isothioharnstoffderivate, Auch bei diesen Substanzen war das Vorhandensein einer freien Aminogruppe eine conditio sina qua non für die Auslösung der reflektorischen Atemhemmung. Die wirksamsten Verbindungen hatten alle folgende Struktur: Aromatischer Kern — kurze Seitenkette — freie Aminogruppe. Die Befunde von Dawes und Mitarbeitern treffen auch für die hier untersuchten Phenylalkylamine zu.

Zu einer chemisch völlig anderen Gruppe von Substanzen, die ebenfalls die reflektorische Atemhemmung auslösen, gehören verschiedene Antihistaminica, die Orias, Gilbert und Brooks beschrieben haben. Auch Aviado, Pontius und Li untersuchten zahlreiche Antihistaminverbindungen (Colamin-, Äthylendiamin- und Propylaminderivate). Sie fanden keine Beziehung zwischen der atemhemmenden und der Antihistaminwirkung. Die Substanzen, die den Atemreflex auslösten, hatten folgende gemeinsame Eigenschaften: 1. sie besaßen mindestens einen tertiären Stickstoff, dessen Valenzen durch C-Atome besetzt waren. Primäre und sekundäre Amine sowie quaternäre Ammoniumbasen waren unwirksam. 2. Alle wirksamen Verbindungen waren Äthylamine, die mittels Ätherbindung oder durch ein Amin an ein cyclisches Radikal gebunden waren. Verbindungen mit einer Verlängerung oder Verkürzung der Äthylkohlenstoffkette waren unwirksam. Diese beiden Grundeigenschaften besitzen ebenfalls die von Walker, Jones und Richardson untersuchten zum Teil hydrierten Pyridindenderivate (Abkömmlinge des Thephorins). Ferner kann man zu dieser Klasse den Phenyldiallylessigsäure-Diäthylaminoäthanolester rechnen, dessen atemhemmende Wirkung in einer vorgegangenen Mitteilung beschrieben wurde. Neubert und Herken fanden nach Vorbehandlung mit dem Phenyldiallylessigsäure-Diäthylaminoäthanolester eine Verlängerung der Wirkungsdauer von Barbitursäurederivaten, die als Kurznarkotica Verwendung finden und im Stoffwechsel durch Oxydation entgiftet werden. Die Frage, ob diese Hemmung oxydativer Stoffwechselprozesse auch für die Auslösung der reflektorischen Atemhemmung von Bedeutung ist, muß offenbleiben.

Andere atemhemmende Verbindungen lassen sich kaum einer der nach chemischen Gesichtspunkten gebildeten Gruppen zuordnen. So haben z. B. die von Walker, Wilson, Farrar und Richardson als atemhemmende Substanzen beschriebene 3 Hydroxy-2-phenyl-Cinchoninsäuren, die außerdem antidiuretisch wirken, mit den voranstehenden Verbindungen nur noch den tertiären Stickstoff gemeinsam. Das gleiche gilt für die Veratrumalkaloide Veratin und Cevadin. Capsaicin (Decylensäurevanillylamid), welches nach Pórszász, György und Pórszász-Gibiszer ebenfalls reflektorisch die Atmung stillstellt, besitzt überhaupt keine der genannten chemischen Merkmale. Auffallend ist allerdings die Strukturähnlichkeit des Vanillins mit der im Veratrin enthaltenen Veratrumsäure.

Die Existenz solcher chemisch verschiedenen Gruppen atemhemmender Substanzen, deren pharmakologische Beeinflußbarkeit sich unterscheidet, läßt an die Möglichkeit des Vorhandenseins *verschiedener* Receptoren im Ausbreitungsgebiet der A. Pulmonalis denken.

Zusammenfassung

In früheren Untersuchungen wurde die reflektorische Atemhemmung durch p-Chlorphenyläthanolamin genauer analysiert. Im Zusammenhang damit wird in der vorliegenden Arbeit über pharmakologische

Eigenschaften des p-Chlorphenyläthanolmethylamins berichtet, welches keine Atemhemmung verursacht. Auch das Phenyläthanolamin besitzt keinen Einfluß auf die Atmung. Die Befunde werden in Zusammenhang mit bereits vorliegenden Ergebnissen über andere atemhemmende Substanzen diskutiert.

Der Firma Riedel de Haën, Berlin-Britz, bin ich für die Überlassung der benutzten Substanzen zu Dank verpflichtet.

Literatur

AVIADO jr., D. M., R. G. PONTIUS and T. H. LI: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **99**, 425 (1950). — DAWES, G. S., and J. C. MOTT: Brit. J. Pharmacol. **5**, 65 (1950). — DAWES, G. S., and F. N. FASTIER: Brit. J. Pharmacol. **5**, 323 (1950). — HEUBNER, W., u. D. VIESSMAN: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **220**, 40 (1953). — KRAMER, M.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 148 (1954). — NEUBERT, D., u. H. HERKEN: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 453 (1955). — ORIAS, O., J. L. GILBERT and CH. MCC. BROOKS: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **97**, 492 (1949). — PŐRSZÁSZ, J., L. GYÖRGY u. K. PÓRSZÁSZ-GIBISZER: Acta physiol. (Budapest) **8**, 61 (1955). — WALKER, H. A., S. WILSON, C. FARRAR and A. P. RICHARDSON: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **104**, 211 (1952). — WALKER, H. A., P. S. JONES and A. P. RICHARDSON: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **109**, 301 (1953).

Dr. M. KRAMER, Berlin-Dahlem, Pharmakol. Institut d. Fr. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 425—433 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. F. Brücke)

Einfluß des lokalen Wundstarrkrampfes auf die Kaliumfreisetzung aus der Skeletmuskulatur durch Acetylcholin

Von

W. Kobinger, O. Kraupp, H. Stormann und P. H. Clodi

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. Januar 1956)

Unser derzeitiges Wissen über den pathophysiologischen Mechanismus des lokalen Wundstarrkrampfes verdanken wir im wesentlichen den grundlegenden Arbeiten von Abel[1,2], Harvey[5], Göpfert und Schaefer[4] und Schaefer[9], in denen vor allem die periphere Natur der lokalen Tetanuserkrankung sicher gestellt wurde. Der lokale Tetanus ist an die Funktionstüchtigkeit der motorischen Endplatte gebunden und besteht einerseits aus einem durch pathologisch verstärkte proprioceptive Reize ausgelösten reflektorisch-tonischen Anteil sowie andererseits aus einer im vorgeschrittenen Stadium der Erkrankung auftretenden aktionsstromlosen rein muskulären Kontraktur. Außerdem sprechen eine Reihe von Beobachtungen für eine schwere Störung der neuromuskulären Erregungsüberleitung wie unter anderem Veränderungen des Endplattenaktionsstromes[4], Herabsetzung der Reizschwelle für die Auslösung von Muskelaktionsströmen vom Nerven her, Herabsetzung der Kontraktionshöhe bei indirekter Einzelreizung[5] und nicht zuletzt ein veränderter Kontraktionsablauf nach naher arterieller Injektion von Acetylcholin[5].

In der vorliegenden Arbeit wurde nun versucht, die nach Einwirkung von Tetanustoxin auftretenden Veränderungen der Reaktionen der neuromuskulären Endplattenmembran an Hand des Verlaufes der Kaliumfreisetzung aus der Muskulatur isoliert durchströmter Katzenextremitäten nach intraarteriellen Injektionen von Acetylcholin (ACh) einer näheren Untersuchung zu unterziehen.

Methodik

Die Versuche wurden an Katzen im Gewichte von 2—3 kg durchgeführt. An jedem Versuchstier wurde an einer Extremität durch multiple intramuskuläre Injektionen von Tetanustoxin ein lokaler Wundstarrkrampf der gesamten Extremitätenmuskulatur erzeugt. Als Toxin kam ein Präparat des

bundesstaatlichen serotherapeutischen Institutes Wien zur Anwendung, dessen letale Meerschweinchendosis mit 75 γ/kg angegeben wurde*. Von diesem Toxin wurden 1,35 mg/kg (— entspricht bei Berücksichtigung des Empfindlichkeitsverhältnisses Katze : Meerschweinchen[3] ungefähr $^1/_{200}$ der Dosis letalis für Katzen —) in je 0,5 ml/kg physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und in Äthernarkose mittels einer feinen Intrakutannadel unter aseptischen Bedingungen durch 40—50 Einstichstellen in den Gastrocnemius-, tibialis- und quadriceps-Muskel sowie in die Beuger und Adduktoren des Oberschenkels möglichst gleichmäßig verteilt. Die Tiere wurden in verschiedenen Zeitabständen (3—21 Tagen) nach der Injektion des Toxines für den Durchströmungsversuch herangezogen. Die isolierte Durchströmung der hinteren Extremität erfolgte in derselben Anordnung wie in [8], wobei als Durchströmungsflüssigkeit wieder eine Blut-Tyrode Verdünnung 1 : 5 (genaue Zusammensetzung siehe [8]) verwendet wurde. Acetylcholinbromid wurde in stets konstantem Lösungsvolumen (1 ml) in den Aortenschlauch injiziert; da sich die in die Aorta injizierten Gesamtdosen im Verhältnis der jeweiligen Durchflußgrößen auf beide Extremitäten aufteilten, wurden die tatsächlichen ACh-Dosen für jede Extremität aus der Gesamtdosis und dem Durchflußverhältnis errechnet. Das aus beiden Venae femorales austretende Blut wurde getrennt in Sammelperioden zu je 2 min aufgefangen, zentrifugiert und der Kaliumgehalt in derselben Weise wie in [8] flammenphotometrisch bestimmt.

Versuchsergebnisse

1. Verlauf der Tetanuserkrankung an den Versuchstieren

24—48 Std nach der Toxinapplikation trat an der injizierten Extremität eine andauernde Starre der gesamten Muskulatur auf, die innerhalb der ersten Woche noch eine passive Beweglichkeit zuließ und durch Narkose weitgehend aufgehoben werden konnte. Von der zweiten Woche an ging auch die passive Beweglichkeit sowie die erschlaffende Wirkung der Narkose in zunehmendem Maße verloren, wobei eine extreme Streckstellung in Sprung-, Knie- und Hüftgelenk bestand. Dieser Zustand hielt bis zum Ende der Versuche unverändert an (längste Beobachtungsdauer: 21 Tage). Die unbehandelte Extremität zeigte innerhalb der ersten 5 bis 7 Tage keine grob sichtbaren Veränderungen. Als erstes Anzeichen eines pathologischen Verhaltens konnten an der unbehandelten Extremität Streckkrämpfe, meist vergesellschaftet mit einem Opisthotonus beobachtet werden, die reflektorisch nach passiver und aktiver Bewegung der erkrankten Extremität auftraten. Diese Krämpfe nahmen im weiteren Verlaufe an Dauer und Häufigkeit zu, wobei schließlich in fast allen Fällen gegen Ende der zweiten Woche auch an der unbehandelten Extremität eine Dauerstarre in Erscheinung trat, die jedoch innerhalb der Beobachtungszeit noch eine passive Beweglichkeit zuließ und durch Narkose weitgehend aufgehoben werden konnte.

* An dieser Stelle möchten wir Herrn Dr. F. Kail und Fräulein Neugebauer unseren aufrichtigen Dank für die Überlassung des Toxins sowie für wertvolle Ratschläge aussprechen.

2. Kaliumfreisetzung durch intraarterielle Einzelinjektionen von Acetylcholin

Von den insgesamt 11 Durchströmungsversuchen wurden zwei 3 Tage, drei 6—8 Tage, drei 14 Tage und drei 21 Tage nach der Einbringung des Tetanustoxines durchgeführt. In allen Versuchen wurden die Differenzen zwischen der Kaliumkonzentration der ausströmenden und der der einströmenden Flüßigkeit (im folgenden VA Differenz bezeichnet) während

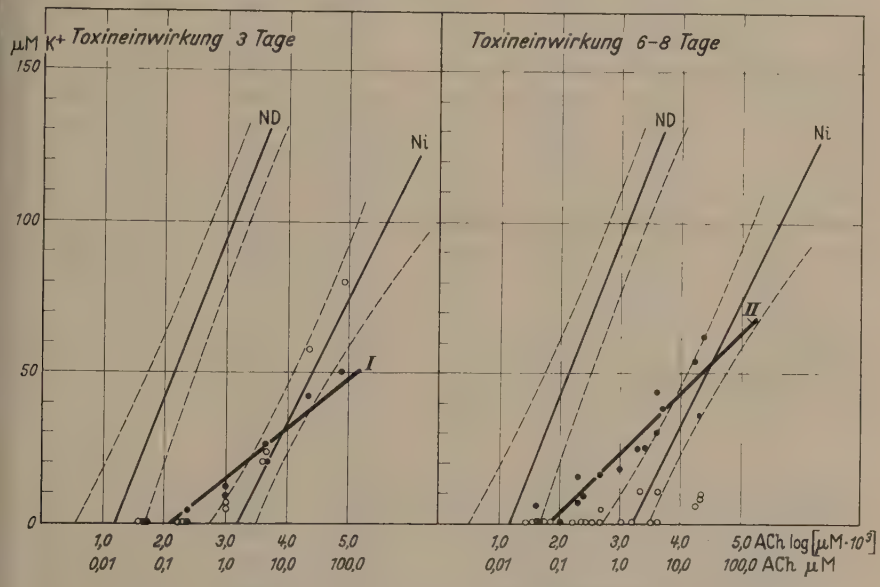


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 1. Kaliumfreisetzung durch ACh an der normalen (○) und an der vom lokalen Tetanus ergriffenen (•) Muskulatur. Dauer der Toxineinwirkung: 3 Tage. (I): Dosis-Wirkungskurve für die Tetanusmuskulatur, Ni: Dosis-Wirkungskurve der Kaliumfreisetzung durch ACh des normalinnervierten Muskels[8] und ND: entsprechende Kurve des chronisch denervierten Muskels[8], die gestrichelten Kurven stellen die Confidenzintervalle der Geraden dar. Ordinate: µM Kaliumionen. Abszisse: Logarithmen der ACh-Dosen (Nullpunkt des Abszissenmaßstabes bei log ACh 10^{-2} Mol)

Abb. 2. Kurven und Meßpunkte haben dieselbe Bedeutung wie in Abb. 1, Dauer der Toxineinwirkung: 6—8 Tage

der gesamten Versuchsdauer laufend nach der in der Methodik angegebenen Weise bestimmt. Die zu Beginn der Versuche vor Verabreichung des ACh beobachteten KaliumVA Differenzen betrugen im Durchschnitt an der normalen Extremität: 0,36 mMol/l und an der Tetanus-Extremität: 0,43 mMol/l und waren voneinander statistisch nicht signifikant verschieden.

Zur Berechnung der nach einzelnen intraarteriellen ACh Injektionen zusätzlich aus der Muskulatur in Freiheit gesetzten Kaliummengen wurden zunächst die Differenzen zwischen den Kaliumausflußkonzentrationen in den Sammelperioden unmittelbar nach der ACh Injektion

Tabelle 1

Vers. Nr.	Zeit nach Injektion des Tetanustoxins in Tagen	normale Extremität			Toxinbehandelte Extremität		
		Log ACh Dosis (μM)	Kalium in μM	Fluß cc/min	Log ACh Dosis (μM)	Kalium in μM	Fluß cc/min
TK 2	3	0,653—2	0	21,0	0,643—2	0	19,0
	3	0,322—1	0	23,0	0,371—1	0	27,0
	3	0,049	7	24,0	0,033	12	24,0
	3	0,651	24	22,5	0,643	26	23,0
	3	1,342	58	19,0	1,348	42	20,0
	3	1,961	80	22,0	1,932	50	22,0
TK 13	3	0,602—2	0	15,0	0,609—2	0	16,0
	3	0,301—1	0	14,5	0,380—1	4	16,0
	3	0,021	5	13,5	0,061	9	15,5
	3	0,613	20	11,5	0,679	20	14,5
TK 1	6	0,653—2	0	22,5	0,633—2	6	19,5
	6	0,380—1	0	22,0	0,301—1	15,5	23,0
	6	0,029	0	21,0	0,057	18,0	23,5
	6	0,672	0	22,0	0,617	30	21,0
	6	1,365	10	21,5	1,322	36	21,0
TK 3	8	0,633—2	0	12,5	0,653—2	0	12,5
	8	0,362—1	0	15,0	0,322—1	7,5	14,5
	8	0,664—1	0	14,5	0,623—1	16,0	14,0
	8	0,375	11,5	13,0	0,316	25	12,0
	8	0,677	11,0	13,5	0,613	44,5	12,0
	8	1,348	7,5	9,5	1,342	54	8,0
TK 5	8	0,471—2	0	9,0	0,602—2	0	13,0
	8	0,845—2	0	7,5	0,000—1	0	12,0
	8	0,230—1	0	7,0	0,431—1	9	11,0
	8	0,544—1	0	7,5	0,724—1	4	11,5
	8	0,225	0	7,0	0,436	25,5	11,5
	8	0,538	0	7,5	0,733	38,0	12,0
	8	1,248	6	7,0	1,423	62,0	11,5
TK 4	14	0,602—2	0	13,5	0,698—2	20	19,0
	14	0,301—1	0	16,0	0,380—1	59	20,0
	14	0,602—1	0	15,5	0,690—1	67	18,5
	14	0,079	13	15,5	0,164	58	18,5
	14	0,592	24,5	14,0	0,695	106	17,0
	14	1,305	61	14,0	1,384	157	17,0
TK 7	14	0,602—2	0	18,0	0,602—2	11	18,0
	14	0,903—2	0	15,0	0,903—2	10	15,0
	14	0,342—1	0	14,0	0,342—1	14	14,0
	14	0,336	17	14,0	0,314	44	14,0
	14	0,646	19,5	13,0	0,646	55	12,5
	14	1,342	27	13,0	1,342	85	12,5
TK 11	14	0,579—2	0	12,0	0,698—2	0	14,0
	14	0,903—1	7	11,0	0,987—1	22	15,0
	14	0,518	10	9,0	0,740	47	14,0
	14	0,531	10,0	9,0	—	—	—

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Vers. Nr.	Zeit nach Injektion des Tetanustoxins in Tagen	normale Extremität			Toxinbehandelte Extremität		
		Log ACh Dosis (μM)	Kalium in μM	Fluß cc/min	Log ACh Dosis (μM)	Kalium in μM	Fluß cc/min
TK 8	20	0,623—2	0	13,0	0,672—2	12	17,0
	20	0,778—2	0	10,0	0,041—1	16	17,5
	20	0,176—1	0	9,5	0,462—1	31	20,0
	20	0,303	14	10,0	0,384	56	17,0
	20	0,531	13	10,5	0,740	88	16,0
	20	—	—	—	1,468	129	16,0
TK 9	21	0,623—2	0	18,5	0,663—2	0	20,0
	21	0,929—2	0	16,0	0,954—2	7	19,0
	21	0,301—1	0	14,5	0,380—1	6	18,0
	21	0,892—1	0	13,0	0,000	22	17,5
	21	0,274	11	13,5	0,407	26	19,5
	21	0,602	16	12,0	0,685	37	12,5
	21	1,568	48	11,5	1,652	80	12,0
TK 10	20	0,663—2	0	19,0	0,623—2	4	17,5
	20	0,361—1	0	17,5	0,326—1	17	16,5
	20	0,954—2	0	16,5	0,939—2	2,5	15,5
	20	0,376	15	17,0	0,316	37	15,0
	20	0,675—1	0	17,0	0,616—1	16,5	14,0
	20	1,371	30,5	15,0	1,318	85	14,0
	20	1,061	19,0	14,0	1,027	65	13,5

und den entsprechenden Konzentrationswerten in den Kontrollperioden vor bzw. 10—20 min nach der Injektion bestimmt. Diese Differenzen (= nach ACh auftretende Anstiege der VA Differenzen) wurden mit den Durchflußvolumina der dazugehörigen Sammelperioden multipliziert und die so erhaltenen Produkte aller Sammelperioden mit erhöhter Kaliumausflußkonzentration zusammengezählt. Die auf diese Weise in den einzelnen Versuchen nach verschiedenen ACh-Dosen erhaltenen Werte der zusätzlichen Kaliumfreisetzung sind in Tab. 1 Spalte 4 und 7 zusammen mit der Dauer des Tetanus (Spalte 2) und den jeweiligen durchschnittlichen Durchflußmengen (Spalte 5 und 8) wiedergegeben.

Für eine übersichtliche Darstellung des Einflußes der lokalen Tetanuserkrankung auf die durch ACh hervorgerufene Kaliumfreisetzung sowie für den Vergleich mit der chronisch denervierten Extremität wurden die Ergebnisse der Tab. 1 genau wie in früheren Arbeiten [7, 8] in Form von log Dosis Wirkungskurven graphisch dargestellt und den entsprechenden Kurven des normalen (NI)[8] bzw. denervierten Muskels (ND)[8] gegenübergestellt. Um dabei gleichzeitig auch einen Einfluß der Dauer der Tetanuserkrankung in Rechnung zu stellen, wurden die Versuche mit gleicher Dauer der Toxineinwirkung zusammengefaßt und getrennt dargestellt (Abb. 1—4). Aus den Ergebnissen der Tab. 1 sowie aus den graphischen

Darstellungen der Abb. 1—4 lassen sich folgende Feststellungen treffen:

1. 3 Tage nach der Toxininjektion ist noch kein deutlicher Unterschied in den Werten der Kaliumfreisetzung zwischen tetanischem und normalem Bein feststellbar (Abb. 1). Mit Ausnahme dreier Werte des mit Tetanustoxin behandelten Beines liegen sämtliche Meßpunkte der Tetanus- und der normalen Extremität innerhalb des in einer früheren

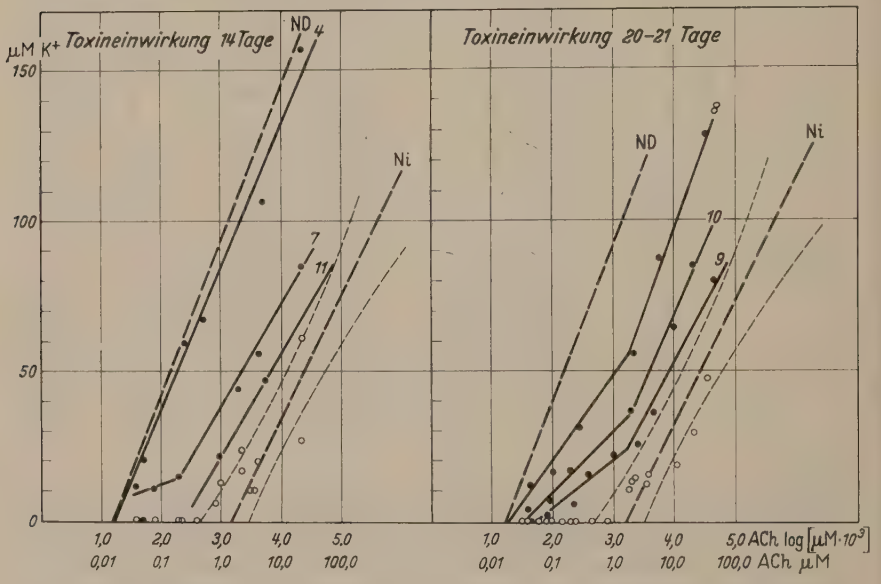


Abb. 3

Abb. 4

Abb. 3. Kaliumfreisetzung durch ACh an der normalen (○) und an der vom lokalen Tetanus ergriffenen (•) Extremität. Dauer der Toxineinwirkung: 14 Tage. Ni: Dosis-Wirkungskurve der Kaliumfreisezung aus[8] für den normalen innervierten Muskel, ND: entsprechende Kurve aus[8] für den chronisch denervierten Muskel; ausgezogene Linien: Dosis-Wirkungskurven der Tetanusmuskeln innerhalb der einzelnen Versuche (TK 4, 7, u. 11), gestrichelte Kurven: Begrenzung des Confidenzintervalles für den normal innervierten Muskel. Ordinate: µM Kaliumionen; Abszisse: Logarithmen der ACh-Dosen (Nullpunkt des Abszissenmaßstabes bei log ACh 10^{-9} Mol)

Abb. 4. Kurven und Meßpunkte haben dieselbe Bedeutung wie in Abb. 3; Dauer der Toxineinwirkung: 21 Tage

Arbeit[8] ermittelten Confidenzbereiches der Kaliumausschüttung des normal innervierten Muskels. Die Berechnung der Regressionsgeraden der Kaliumfreisetzung durch ACh der Tetanus-Extremität ($y_K = -34{,}3 + 16{,}4$ (log ACh + 3)) sowie des Confidenzintervalles des dazugehörigen Regressionskoeffizienten ($11{,}22 < \beta < 21{,}53$) ergab jedoch, daß die Steigung der Dosis-Wirkungskurve der Kaliumfreisetzung durch ACh an der Tetanus-Extremität nach 3tägiger Toxineinwirkung signifikant flacher als der entsprechende Wert des normalen Muskels ist (Vgl.: (NI) und I in Abb. 1).

2. 6—8Tage nach der Toxineinwirkung ist bereits eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung der Tetanusextremität gegenüber der kaliumfreisetzenden Wirkung des ACh besonders im niederen ACh-Dosenbereich ausgeprägt (Abb. 2). Die Berechnung der Dosis-Wirkungskurve (II, Abb. 2) ($y_K = -33{,}1 + 18{,}7$ (log ACh $+ 3$)) sowie der Confidenzintervalle der Steigung ($14{,}15 < \beta < 23{,}23$) ergab auch hier ähnlich wie bei den 3 Tageversuchen einen signifikant flacheren Verlauf der Regressionsgeraden gegenüber der normal innervierten Muskulatur (N1 d. Abb. 2).

3. Bei den Versuchen mit 14- bzw. 20- und 21tägiger Toxineinwirkung konnte wegen einer starken Streuung der Versuche untereinander keine einheitliche mathematische Darstellung in Form einer allen Versuchen gemeinsamen Dosis-Wirkungskurve durchgeführt werden. Aus diesem Grunde wurden in Abb. 3 und 4 die tatsächlich experimentell gefundenen Dosis Wirkungskurven der Einzelversuche eingezeichnet. Sämtliche Kurven lassen eine deutliche Verstärkung der Kaliumfreisetzung der Tetanusextremität sowohl gegenüber der unbehandelten Kontrollextremität wie auch gegenüber normal innervierten Extremitäten früherer Versuche[8] erkennen; die einzelnen Meßpunkte der Tetanusextremität liegen durchwegs außerhalb des Confidenzbereiches der normal innervierten Muskulatur. Am stärksten ist diese Empfindlichkeitssteigerung im Versuch TK 4 ausgeprägt, dessen Dosis-Wirkungskurve praktisch den gleichen Verlauf wie die der chronisch denervierten Muskulatur zeigt (vgl. Kurve 4 mit ND in Abb. 3). Auch bei diesen Versuchen tritt im Bereiche niederer ACh-Dosen noch teilweise eine deutlich erkennbare Abflachung der Dosis-Wirkungskurven in Erscheinung (Abb. 4 Kurve 8, 9 u. 10).

4. Die Werte der Kaliumfreisetzung an der unbehandelten Extremität liegen in allen 4 Versuchsgruppen zum größten Teil im Confidenzbereich des normal innervierten Muskels und ließen daher kein vom normalen abweichendes Verhalten erkennen (in Abb. 1—4).

Besprechung der Versuchsergebnisse

Die Wirkung der lokalen Tetanuserkrankung auf die Kaliumfreisetzung durch ACh läßt nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deutlich zwei Komponenten erkennen: 1. Eine allgemeine und für alle Dosenbereiche von ACh in gleicher Weise erfolgende Verstärkung der Kaliumfreisetzung, kenntlich an einer Parallelverschiebung der Dosis-Wirkungskurven in Richtung der Kurve der denervierten Muskulatur. Dieser Effekt ist besonders nach 14- und 21tägiger Toxinwirkung ausgeprägt (Abb. 3 und 4). 2. Eine elektive Verstärkung der Wirkung niederer ACh Dosen bei gleichzeitiger Unbeeinflußung oder Abschwächung der Wirkung hoher ACh-Dosen, kenntlich an einem geringeren Wert der Steigerung der Dosis-Wirkungsbeziehungen wie dies besonders bei den

Versuchen mit 3tägiger sowie vor allem mit 7tägiger Einwirkungsdauer des Toxins in Erscheinung trat. (Abb. 1 und 2). Die in Punkt 1 angeführte Parallelverschiebung der Dosis-Wirkungsgeraden in die Bereiche kleinerer ACh-Dosen kennzeichnet das Verhalten des chronisch denervierten Muskels[8]. Als Erklärung wurde angeführt, daß nach Wegfall elektiv gegenüber ACh wirkender neuraler Abschlußbarrieren der Endplattenkammer durch die chronische Denervierung ein größerer Bruchteil des verabreichten ACh zur Einwirkung auf die muskuläre Endplattenmembran kommt[8]. Eine ähnliche Wirkung muß nunmehr auch dem Tetanustoxin zugeschrieben werden, wobei der Prozeß der Zerstörung offenbar etwas langsamer vor sich geht (Maximum erst nach etwa 14 Tagen) und überdies unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen nicht alle Endplatten gleichzeitig und vollständig erfaßt, so daß die volle Wirkung wie bei der chronischen Denervation nur ausnahmsweise wie z. B. in Versuch TK 4 auftritt. Diese einer partiellen chronischen Denervierung gleichzusetzende Wirkung des Tetanustoxins kann auch zur Erklärung der von Harvey[5] beobachteten Wirkung intraarterieller ACh-Injektionen auf die Muskulatur im lokalen Tetanus herangezogen werden, wonach neben einer Zuckung auch eine für den denervierten Muskel typische Nachkontraktur auftrat. Die unter Punkt 2 angeführte Abflachung der Dosis-Wirkungsgeraden der Kaliumfreisetzung durch ACh bei gleichzeitiger Herabsetzung der ACh-Grenzdosen wurde bereits in ähnlicher Weise an der curarisierten chronisch denervierten Muskulatur[7] und bei Herabsetzung der extracellulären NaCl Konzentration sowohl an denerviertem wie innerviertem Muskel[6] beobachtet. Eine solche Wirkung spricht nach bisherigen Erfahrungen und Überlegungen[6, 7, 8] entweder für eine Herabsetzung der Depolarisierbarkeit der Endplattenmembran durch ACh oder für eine Reduktion der wirksamen Endplattenoberfläche; im Falle des lokalen Tetanus scheint daher diese Beobachtung auf eine schädigende Wirkung des Toxins an den muskulären Anteilen der Endplatte hinzuweisen, die aber eigenartiger Weise hauptsächlich in der 1. Woche der Toxineinwirkung in Erscheinung trat, später jedoch nur mehr angedeutet nachzuweisen war.

An der unbehandelten Extremität konnte in allen Versuchen keine Steigerung der Kaliumfreisetzung durch ACh beobachtet werden, obwohl vor allem in den länger dauernden Versuchen in den meisten Fällen reflektorisch auftretende Krampfanfälle sowie andauernde Starre aufgetreten sind.

Die an der Toxin behandelten Extremität beobachteten Veränderungen der Kaliumfreisetzung durch ACh bilden einen neuerlichen Beweis für eine periphere Wirkungskomponente des Tetanustoxines, dessen Angriffspunkt an den neuralen und muskulären Anteilen der motorischen Endplatte wahrscheinlich gemacht wurde.

Summary

The release of potassium ions from muscle in the state of local tetanus on intraarterial injection of acetylcholine (ACh) was investigated by isolated perfusion of hind limbs in cats. Local tetanus was produced by multilocular injection of tetanustoxin in one of the hind limbs. The reactions of the normal innervated muscles and those treated with tetanustoxin were compared in the same animal. The following results were obtained:

1. 3 days after the toxin application no significant changes in the potassium release following the ACh administration were to be seen.

2. 6 to 8 days after the toxin injection a significant reduction in the ACh threshold dose necessary for a measurable potassium release could be observed on the muscle in tetanus. At this time the regression coefficient of the dose response curve for the potassium release was significantly lower compared with the corresponding value of the normal muscle.

3. 14 to 21 days after the injection of the tetanus toxin a significant and considerable shift of the dose response curve of the potassium release towards that observed in chronically denervated muscle was seen on the muscle in tetanus.

4. The untreated muscle did not show any sings of changed sensitivity against acetylcholine, although symptoms of reflex spasms and maintained rigidity were already seen in some experiments.

Literatur

[1] Abel, J. J., Jr. E. A. Evans, B. Hampil and F. C. Lee: Researches on Tetanus II, the toxin of the bac. Tetani is not transported to the Central Nervous system by any component of the peripheral nerve trunks. Bull. Johns Hopkins Hosp. **56**, 84—114, (1935). — [2] Abel, J. J., B. Hampil, and Jr. A. F. Jonas: Researches on Tetanus III, Further experiments to prove that the tetanus toxine is not carried in peripheral nervus to the Central Nervous system. Bull. Johns Hopkins Hosp. **56**, 317—336, (1935). — [3] Eisler, M.: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Tetanus, IV, 17, Verlag: Fischer u. Urban und Schwarzenberg (1928). — [4] Göpfert, H. ,u. H. Schaefer: Über die Mechanik des Wundstarrkrampfes, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **197**, 93—122, (1941). — [5] Harvey, A.M.: The peripheral action of Tetanus toxin, J. of Physiol. **96**, 348—365, (1939). — [6] Kraupp, O.: Elektrolytverschiebungen in der innervierten und denervierten Skeletmuskulatur durch Acetylcholin bei Durchströmung mit natriumchloridarmer Blut-Tyrode Lösung. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. im Druck. — [7] Kraupp, O., W. Kobinger, H. Stormann u. G. Werner: Über den Einfluß von Eserin und d-Tubocurarin auf die Freisetzung von Kaliumionen aus der Skeletmuskulatur durch Acetylcholin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 403—416, (1955). — [8] Kraupp, O., G. Werner, W. Kobinger u. H. Stormann: Freisetzung von Kaliumionen aus innervierter und denervierter Skeletmuskulatur durch intraarterielle Injektionen von Acetylcholin, Arch. exper Path. u. Pharmakol. **226**, 301—318, (1955). — [10] Schaefer, H.: Weitere Untersuchungen zum Mechanismus und zur Therapie des Wundstarrkrampfes, Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **203**, 59—84, (1944).

Dr. Dr. O. Kraupp, Pharmalokogisches Institut der Universität,
Wien IX/Österreich, Währingerstr. 13a

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 434—456 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Die Wirkung von Vasopressin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte bei Veränderungen der Salzkonzentration des Trinkwassers und nach Nierenparenchymresektionen

Von

H. Brunner, G. Kuschinsky u. G. Peters*

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Januar 1956)

Die bekannten Untersuchungen von E. B. Verney (1926, 1929, 1946, 1947, 1948) haben gezeigt, daß die Ausschüttung von Hypophysenhinterlappen (HHL)-Hormonen in die Blutbahn vom wirksamen osmotischen Druck, d. h. in erster Linie von der Salzkonzentration des Blutplasmas und der Extracellulärflüssigkeit gesteuert wird: Senkung des wirksamen osmotischen Drucks führt zu einer Hemmung, Steigerung z. B. durch Injektion hypertonischer Salzlösungen in die A. carotis zu einer Anregung der Ausschüttung. Nun ist aber andererseits seit langem erwiesen, daß eines der HHL-Hormone, dessen Identität mit Vasopressin heute feststeht (R. L. Stehle 1933, 1934; R. L. Stehle, A. M. Fraser 1935; A. M. Fraser 1941), die *Wasser*diurese aller untersuchten Tierarten zu hemmen vermag, und daß im Durst die Salzkonzentration von Plasma und Extracellulärflüssigkeit ansteigt. Somit lag der zuerst von L. Goodman u. A. Gilman (1941) in allgemeiner Form formulierte Gedanke nahe, daß das Absinken der Wasserausscheidung im Durst auf einer Vasopressin (Vpr.)-Ausschüttung beruhen könnte. Für die grundsätzliche Analogie der Einwirkung von Durst und von Erhöhung der Salzkonzentration des Plasmas auf die HHL-Hormonausschüttung spricht die Beobachtung, daß Dursten und die orale Gabe von hypertonischer Kochsalzlösung (5%) bei Ratten zur Ausschüttung etwa gleich großer Mengen von wahrscheinlich aus dem HHL stammendem antidiuretischem Material im Harn führen (A. Gilman, L. Goodman 1937; W. L. Lipschitz, E. Stokey 1947) — und daß andererseits Wasserverluste nicht zur

* Ein Teil der Ergebnisse wurde von einem von uns (G. P.) auf der Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Graz (1955) mitgeteilt.

HHL-Hormonausschüttung führen, wenn sie mit gleichzeitigen Salzverlusten einhergehen (W. L. Lipschitz, E. Stokey 1947).

Offen bleibt lediglich die Frage, ob Vpr. überhaupt unter seinen „physiologischen" Ausschüttungsbedingungen, d. h. bei mittleren und gesteigerten Salzkonzentrationen der Extracellulärflüssigkeit die Diurese nennenswert zu verlangsamen vermag. Das ist nach dem Ergebnis der vorliegenden Untersuchung, in der die Abhängigkeit der antidiuretischen Vpr.-Wirkung von der NaCl-Konzentration der „Wässerungsflüssigkeit" ermittelt wurde, bei der Ratte nicht der Fall. Andererseits erwies sich das Ausmaß der antidiuretischen Vpr.-Wirkung als unabhängig von der Menge des vorhandenen funktionierenden Nierenparenchyms, solange durch die orale Gabe von größeren Wassermengen eine Wasserdiurese erzeugt werden konnte — Schließlich erschien es besonders im Hinblick auf die recht widerspruchsvollen Theorien über Kausalzusammenhänge zwischen Einflüssen auf Wasser- und Salzausschüttung (A. Leaf u. Mitarb. 1953; J. O. Davis u. Mitarb. 1954; O. Schaumann 1949) interessant, die Beeinflussung der renalen Ausscheidung von Na^+, K^+ u. Cl' durch Vpr. und ihre quantitativen Beziehungen zur Beeinflussung der Diurese erneut zu untersuchen.

Methodik

Ratten im Gewicht von 150—250 g erhielten im Abstand von 10 min mit der Schlundsonde 10+8 ml dest. Wasser oder 8+6 ml 0,3% NaCl-Lösung oder 7+5 ml 0,6%, 0,9% oder 1,8% NaCl-Lösung pro Tier. Die Flüssigkeitsmengen waren jeweils so gewählt, daß die zum Zeitpunkt der Hormoninjektion (s. unten) im Organismus vorhandene zusätzliche Wassermenge oberhalb der kritischen Grenze lag, bis zu der eine Steigerung der zusätzlichen Wassermenge noch eine Beschleunigung der Diurese verursacht (H. Brunner G. Kuschinsky, G. Peters, 1956). Die Tiere wurden dann einzeln in Diuresekäfige gesetzt. Von der 20. min nach der 2. Wassergabe ab wurde das Harnvolumen alle 10 min jeweils nach möglichst vollständiger Entleerung der Blase gemessen. Zur Blasenentleerung wurden weibliche Tiere durch Daumendruck auf die Blasengegend und gleichzeitigen Zug am proximalen Schwanzdrittel veranlaßt. Bei männlichen Tieren versagt dieses Verfahren öfter: Gelegentlich läßt sich die Miktion dann noch durch Anheben des Hinterkörpers am Schwanz und Laufenlassen auf den Vorderfüßen einleiten. Tiere, deren Harnvolumen in den ersten 30 min der Harnsammlung um mehr als eine Standardabweichung vom Mittelwert der ganzen Gruppe (40—60 Ratten) abwich, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. 30 min nach Beginn der Harnsammlung wurde die gewählte Vpr.-Dosis von 1, 10, 30, 50 oder 100 mE in 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung am Bauch oder an der caudalen Rückenpartie s.c. injiziert. Der bis dahin entleerte Harn wurde verworfen.

Als Vpr.-Präparat wurde die Ampullenlösung von Tonephin[1] der Farbwerke Hoechst verwandt; da das Präparat nach pressorischen Einheiten standardisiert ist, wurde seine antidiuretische Wirkung nach dem hier geschilderten experimentellen Verfahren in einem 4 Punkttest nach D. J. Finney (1952) mit der des

[1] Wir danken den Farbwerken Hoechst, vorm. Meister Lucius und Brüning, für die Überlassung größerer Versuchsmengen von Tonephin-Ampullen.

internationalen Standards[1] verglichen: Das Wirkungsverhältnis 6 Monate bei Zimmertemperatur aufbewahrter Tonephinampullen zum internationalen Standard war R = 1,03 (Vertrauensgrenzen 0,91—1,51). — Die angewandten Dosen sind in Milli-Einheiten (mE)/Ratte angegeben. Nach der Vpr.-Injektion wurde weitere 90 min lang in 10 min-Abständen die Harnmenge abgelesen. Im Gesamtharn von 90 min wurden Na^+ und K^+ nach Verdünnung flammenphotometrisch (Beckman-Flammenphotometer und -Spektralphotometer), Cl' mercurimetrisch nach G. Kuschinsky u. H. Langecker (1947) bestimmt.

Als Ausdruck der antidiuretischen und diuretischen Wirkungen wurde das Harnvolumen zwischen der 20. und der 50. min nach der Vpr.- bzw. Kontrollinjektion angesehen, das in den Tabellen in ml/Std/Ratte angegeben wird. Da eine signifikante lineare Abhängigkeit der Harnvolumina unbehandelter oder mit Vpr. behandelter Tiere vom Körpergewicht oder der errechneten Körperoberfläche statistisch nicht nachgewiesen werden konnte, wurden die Harnmengen nicht auf KG oder KO bezogen. Auch von der im Organismus zum Zeitpunkt der Injektion vorhandenen zusätzlichen Wassermenge waren die Harnvolumina unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht abhängig, so daß der Koeffizient Harnmenge/per Sonde gegebene Wassermenge minus bis zur Injektion ausgeschiedene Harnmenge (M. Ginsburg 1951) für die einzelnen Vpr.-Dosen innerhalb der Tiergruppen größere Streuungen zeigte als die absoluten Harnvolumina. Auch der von M. Stein, R. Jinks u. I. A. Mirsky (1952) als Ausdruck von antidiuretischen Wirkungen empfohlene Koeffizient Harnmenge in den 20 min vor der s. c. Injektion/Harnmenge 20 min vor der Injektion bis 40 min nach der Injektion wies größere Streuungen auf als die absoluten Harnmengen. Der Verlauf der log Dosis-Wirkungskurve wurde durch die Anwendung des Mirskyschen Koeffizienten nicht beeinflußt.

Alle Versuche wurden vormittags zwischen 7 und 14 Uhr bei konstanter Temperatur von 28 $\pm$ 2° ausgeführt. Jede Vpr.-Dosis wurde bei jeder Salzkonzentration der oral gegebenen Flüssigkeit einer bis zwei Gruppen von 6—8 Tieren gegeben. Jede Gruppe bestand jeweils zur Hälfte aus Weibchen und aus Männchen: Abgesehen von dieser Festlegung erfolgte die Zuteilung zu den Versuchsgruppen nach Zufallskriterien. Unterschiede der Vpr.-Wirkung oder der ausgeschiedenen Harnmengen bei gleichbehandelten Männchen und Weibchen wurden nicht gefunden.

Ausgedehnte Nierenparenchym-Resektionen wurden in folgender Weise vorgenommen: Zunächst wurde in Äthernarkose von einer lumbosacralen Incision aus eine Niere entfernt. Nach einem Zeitraum von 14—20 Tagen, der eingeschaltet wurde, um eine möglichst starke Hypertrophie der übriggebliebenen Niere zu erzielen, wurde diese wiederum in Äthernarkose durch eine lumbosacrale Incision exponiert, sorgfältig vom Perirenalfettgewebe und unter größtmöglicher Schonung der Nierenkapsel auch von der Nebenniere abpräpariert. Dann wurden um den oberen und den unteren Nierenpol je ein Zwirnfaden gelegt und zugezogen, so daß ein normal durchblutetes Nierenstück von etwa einem Drittel des Volumens der ganzen Niere übrigblieb, dessen Form in frontaler Ansicht der eines gleichschenkligen Dreiecks mit der perihilären Gegend als Basis entsprach. Die abgebundenen Nierenstücke wurden jeweils 1—2 mm vom Faden mit einer scharfen Schere abgetrennt, wobei meist geringfügige Sickerblutungen auftreten. Zur Blutstillung wurde bei den ersten operierten Gruppen 10%ige Trichloressigsäure aufgetupft,

[1] Wir danken Herrn Prof. Dr. W. Koll, Direktor des Pharmakologischen Institutes der Max-Planck-Gesellschaft in Göttingen, für die Überlassung von internationalem Neurohypophysenextrakt-Standard sowie von dem antidiuretisch wirkungsgleichen deutschen Sub-Standard.

dann wurde auf die Schnittflächen eine dicke Schicht Terramycin-Polymyxinpuder[1] aufgetragen. Da sich die mechanische blutstillende Wirkung des Puders als ausreichend erwies, wurde auf die Trichloressigsäure-Tupfung später verzichtet. Alle Rückenwunden wurden zweischichtig vernäht. Der Eingriff wurde ohne Operationsmortalität ertragen: Die operierten Tiere überlebten 2—10 Monate: Sie wiesen während dieser Zeit keine Krankheitszeichen auf und nahmen normal an Gewicht zu. Über ihre Nierenfunktionen soll an anderer Stelle berichtet werden.

Versuche an durstenden Ratten: Die Tiere wurden dauernd bei 28 ± 2° gehalten. 24—72 Std vor Versuchsbeginn erhielten sie zusätzlich zu Gerstenkörnerfutter (ergänzt durch 2mal wöchentlich Fischmehl und Lebertran) und Wasser und 0,9%ige NaCl-Lösung ad lib. Sie wurden dann einzeln gewogen und in Diuresekäfige gesetzt. Dann wurde entweder sofort (einsetzender Durstzustand) oder nach 3 Std (ausgeprägter Durstzustand) oder nach 6, 9 oder 14 Std Flüssigkeits- und Nahrungskarenz (Bedingungen der Grunddiurese) die gewählte Vpr.-Dosis in 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (bzw. 0,5 ml 0,9%ige NaCl-Lösung bei den Kontrollen) s. c. injiziert. Vom Zeitpunkt der Injektion ab wurde die Harnmenge stündlich gemessen. Im Harn der ersten 3 Std sowie der 3.—6. Std wurden Na^+, K^+ und Cl' nach den bereits angegebenen Methoden, die Titrationsacidität nach der für die Anwendung im weniger sauren und zu den Bestimmungen stärker verdünnten Rattenharn modifizierten Methode von L. Henderson u. W. W. Palmer (1914) und NH_4^+ nach der Diffusionsmethode von Conway in der Modifikation von K. Steinitz (1942) bestimmt.

Bestimmung der Titrationsacidität: Zu 1 ml unverdünntem bis 1:10 verdünntem Harn wird als Indicator 1 Tropfen einer 1%igen alkoholischen Lösung von Bromthymolblau zugefügt. Titriert wird mit N/500 NaOH (bzw. bei alkalischem Harn mit N/500 H_2SO_4) bis zur Farbtongleichheit mit 1 ml Sörensen-Phosphat-Puffergemisch von p_H 7,4 + 1 Tropfen Bromthymolblau. Vom Titrationswert wird bei saurem Harn die zur Titration von 1 ml Aqua dest. verbrauchte Menge N/500 NaOH abgezogen, bei alkalischem Harn zugerechnet. — Der nach Titration erreichte p_H 7,4 wird im Beckman-p_H-Meter nachkontrolliert. Bei einiger Übung in der Beurteilung des Farbtons und Arbeiten bei Tageslicht ist die p_H-Meter-Kontrolle nicht erforderlich.

Bestimmung von NH_4^+: In die Mittelkammer von Conway-Gefäßen wird jeweils 1 ml Borsäure-Indicatorgemisch eingefüllt (Indicator: 50 mg Methylenblau werden unter vorsichtigem Erwärmen in 50 ml 70% Alkohol gelöst, ebenso werden 100 mg Methylrot in 50 ml Alkohol gelöst: Die beiden Lösungen werden zusammengegossen und in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Zur Herstellung des Borsäure-Indicatorgemischs werden x ml 1% Borsäurelösung mit x Tropfen Indicator versetzt, zur Austreibung von CO_2 1—2 min über der offenen Flamme gekocht und dann unter Verschluß schnell unter der Wasserleitung auf Zimmertemperatur abgekühlt.) Die Gefäße werden schnell verschlossen: Dazu wird der Glasstopfen (oder der Glasdeckel) an den Berührungsstellen mit einer dünnen Schicht einer gesättigten K_2CO_3-Lösung bestrichen. Dann werden in die äußeren Kammern der Conway-Gefäße hintereinander je 0,2 oder 0,4 ml unverdünnter oder verdünnter Harn und 1,0 ml gesättigte Kaliumcarbonatlösung eingefüllt. In die Kontrollgefäße kommt statt Harn Aqua dest. Die Gefäße werden zur Durchmischung von Harn und Alkalilösung mehrfach gedreht und dann bei Zimmertemperatur 1½—2 Std stehengelassen. Nach dieser Zeit hat der Indicator je nach Ammoniakgehalt des Harns eine bläulichgrüne bis hellgrasgrüne Färbung angenommen (Kontrollgefäße:

[1] Wir danken der Firma Chas. Pfizer Inc., Vertreter C. H. Boehringer & Sohn, Ingelheim a. Rh., für die Überlassung von Terramycin-Polymyxinpuder.

schmutzigviolett). Es wird dann — gegebenenfalls unter elektromagnetischem Rühren — aus einer Mikrobürette mit N/50 H_2SO_4 bis zum Umschlag in Hellviolett titriert: Von jedem Titrationswert ist die für die Kontrollgefäße verbrauchte Säuremenge von 0,01—0,05 ml abzuziehen.

Von den Wasserausscheidungen zwischen der 20. und 50. min nach den Injektionen, den Mineralkonzentrationen im Harn sowie den Mineralausscheidungen in 90 min wurden jeweils Mittelwerte und Streuungen berechnet: In den Tabellen ist jeweils Mittelwert $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) angegeben. Die Werte von behandelten und unbehandelten Gruppen wurden nach der Methode der Zwei-Gruppen-Streuungszerlegung (G. W. Snedecor 1950, S. 226) miteinander verglichen. Pearsonsche Korrelationskoeffizienten und Regressionsgerade wurden nach G. W. Snedecor (1950) ausgerechnet.

Ergebnisse

1. Diurese

Während ein NaCl-Gehalt der per os gegebenen Flüssigkeit von 0,3% auf die antidiuretische Wirkung von Vpr. keinerlei Einfluß hatte, war bereits nach Wässerung mit 0,6%iger — also immer noch hypotonischer — NaCl-Lösung keine signifikante Vpr.-Antidiurese mehr nachweisbar. In Abb. 1 sind die Wasserausscheidungen jeweils in Prozent des Mittelwerts der Ausscheidung unbehandelter gleichzeitiger Kontrollen wiedergegeben.

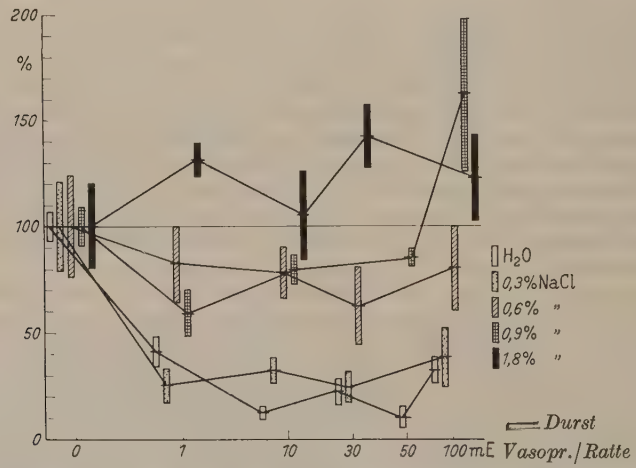


Abb. 1. Wasserausscheidung mit Wasser oder NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen gewässerter Ratten in der 20.—50. min nach der Injektion verschiedener Dosen Vpr. in Prozenten der Mittelwerte der unbehandelten Kontrollgruppen (Ordinate). Die Kolumnen geben jeweils Mittelwert (Querbalken) $\pm$ eine Standardabweichung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) an, so daß die Mittelwerte von sich überschneidenden oder berührenden Säulen nicht signifikant voneinander unterschieden sind. — Abszisse: Vpr.-Dosen in mE Tonephin/Ratte s. c. — Weiße Felder: Wässerung mit H_2O; gepünktelte Felder: Wässerung mit 0,3% NaCl.; gestrichelte Felder: Wässerung mit 0,6% NaCl; gekreuzte Felder: Wässerung mit 0,9% NaCl; schwarze Felder: Wässerung mit 1,8% NaCl.-„Durst": vgl. Text. S. 440

Tabelle 1. *Wasserausscheidung mit Wasser oder NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen gewässerter Ratten zwischen der 20. und 50. min nach der s.c. Injektion verschiedener Vpr.-Dosen in ml/Std/Ratte. Mittelwerte* $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.
In Klammern Zahl der Versuchstiere pro Gruppe. Bezeichnung der Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte der mit Vpr. behandelten Gruppen gegenüber den in gleicher Art gewässerten Kontrollgruppen: $^{+} = P < 0{,}05$, $^{++} = P < 0{,}01$, $^{+++} = P < 0{,}001$

Wässerung mit	Unbehandelte Kontrollen	Vasopressin/Ratte s. c.				
		1 mE	10 mE	30 mE	50 mE	100 mE
H_2O	7,58 ± 0,54 (13)	$3{,}08^{+++}$ ± 0,55 (13)	$0{,}92^{+++}$ ± 0,22 (13)	$1{,}68^{+++}$ ± 0,46 (8)	$0{,}75^{+++}$ ± 0,34 (8)	$2{,}40^{++}$ ± 0,43 (5)
0,3% NaCl	5,30 ± 1,13 (6)	$1{,}30^{++}$ ± 0,44 (6)	$1{,}67^{+}$ ± 0,32 (6)	$1{,}27^{+}$ ± 0,37 (6)		$2{,}00^{+}$ ± 0,76 (6)
0,6% NaCl	3,65 ± 0,86 (6)	3,00 ± 0,66 (6)	2,83 ± 0,45 (6)	2,27 ± 0,66 (6)		2,92 ± 0,71 (6)
0,9% NaCl	3,30 ± 0,29 (23)	$1{,}95^{++}$ ± 0,36 (12)	2,62 ± 0,24 (10)		2,80 ± 0,14 (6)	5,36 ± 1,21 (5)
1,8% NaCl	3,83 ± 0,76 (6)	5,00 ± 0,32 (5)	4,03 ± 0,81 (6)	$5{,}43^{+}$ ± 0,58 (6)		4,67 ± 0,77 (6)

Tabelle 2. *Wasserausscheidung mit Wasser oder 0,9%iger NaCl-Lösung gewässerter normaler oder 20 Tage vorher subtotal nephrektomierter Ratten zwischen der 20. und 50. min nach der s.c. Injektion von Vpr. in ml/Std/Ratte.* (Legende wie bei Tab. 1)

Wässerung mit	Vorbehandlung	Unbehandelte Kontrollen	Vasopressin mE/Ratte s. c.			
			1 mE	10 mE	30 mE	50 mE
H_2O	Normale Tiere	7,58 ± 0,54 (13)	$3{,}08^{+++}$ ± 0,55 (13)	$0{,}92^{+++}$ ± 0,22 (13)	$1{,}68^{+++}$ ± 0,46 (8)	$0{,}75^{+++}$ ± 0,34 (8)
	Große Nierenresektion	5,00 ± 0,62 (5)	$1{,}47^{++}$ ± 0,52 (3)	$0{,}80^{++}$ ± 0,20 (4)	$0{,}50^{+++}$ ± 0,21 (4)	$1{,}45^{++}$ ± 0,25 (4)
0,9% NaCl	Normale Tiere	3,30 ± 0,29 (23)	$1{,}95^{++}$ ± 0,36 (12)	2,62 ± 0,24 (10)		2,80 ± 0,14 (6)
	Große Nierenresektion	1,30 ± 0,57 (4)	1,80 ± 0,24 (4)	$3{,}00^{+}$ ± 0,37 (4)		1,68 ± 0,96 (6)

Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß nach Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung die Dosis von 1 mE Vpr. noch eine statistisch signifikante, aber mengenmäßig geringfügige Diuresehemmung bewirkte, während mittlere, im Bereich der physiologischen Ausschüttung liegende (vgl. Diskussion) Vpr.-Dosen keine antidiuretische und die hohe Dosis von 100 mE Vpr./Ratte sogar eine eindeutige diuretische Wirkung hatten. (Die Größe der Wasserausscheidung nach 0,6%iger NaCl-Lösung und 0,9%iger NaCl-Lösung unterschied sich bei Vpr.-Dosen von 1—50 mE nicht, sodaß

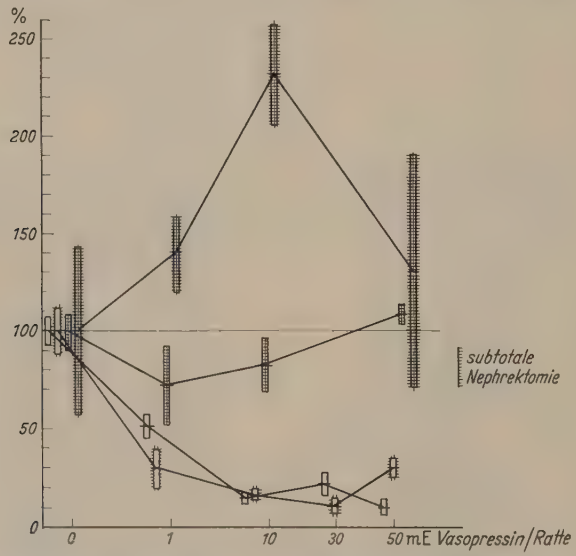


Abb. 2. Wasserausscheidung normaler oder subtotal nephrektomierter Ratten zwischen der 20. und 50. min nach der Injektion steigender Vpr.-Dosen in Prozenten der Mittelwerte der nicht mit Vpr. behandelten Kontrollgruppen. Wässerung mit Wasser oder 0,9% NaCl. Felder mit gestrichelten Rändern: subtotal nephrektomierte Tiere. Alle anderen Bezeichnungen wie in Abb. 1

möglicherweise bei größerer Versuchszahl auch bei Gabe von 0,6%iger NaCl-Lösung eine geringfügige antidiuretische Wirkung der *kleinsten* Vpr.-Dosis nachgewiesen werden könnte.) Zum Vergleich ist in Abb. 1 die Größe der Wasserausscheidung einer Gruppe seit 3 Std durstender Ratten, umgerechnet in Prozent der Mittelwerte der mit den verschiedenen NaCl-Lösungen gewässerten Ratten angegeben: Es ergibt sich, daß eine Diuresehemmung, wie sie im ausgeprägten Durstzustand auftritt, durch Vpr. nur bei vorherigem Bestehen einer starken Wasserdiurese hervorgerufen werden kann. — 1,8%ige NaCl-Lösung, die in unseren Versuchen selbst noch keine osmotische Diurese bewirkt, hebt jegliche antidiuretische Wirkung von Vpr. auf: Die Dosis von 30 mE/Ratte wirkt jetzt diuretisch. —

Die absoluten Größen der Wasserausscheidung in ml/Std/Ratte sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Ein Vergleich der Kontrollen zeigt, daß die Diuresegeschwindigkeit mit steigendem NaCl-Gehalt der Wässerungsflüssigkeit zwischen 0 und 0,9% abfällt. Der Abfall kann wohl nicht durch Verschiedenheiten der Resorptionsgeschwindigkeit aus dem Darm erklärt werden, da zum Zeitpunkt der Messung der Diurese — 90 min nach der oralen Wässerung — die Resorption der gegebenen Mengen hypotonischer Flüssigkeit beendet sein dürfte (E. F. Adolph, J. P. Northrop 1952). — Die unter der Einwirkung von Vpr. in Dosen von 10 mE/Ratte und darüber ausgeschiedenen Wassermengen liegen bei Gabe von 0,6—1,8%iger NaCl-Lösung signifikant höher als nach Wasser oder 0,3% NaCl.

Bei subtotal nephrektomierten Ratten ließ sich 20 Tage nach der Operation durch orale Gabe von Wasser eine Wasserdiurese auslösen, deren maximale Geschwindigkeit nicht geringer war als bei intakten Tieren (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956b), die aber zum Zeitpunkt der Vpr.-Injektion ihren Höhepunkt überschritten hatte (Tab. 2); das gleiche gilt für die Diurese nach Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung.

Abb. 2 zeigt nun, daß die Wasserdiurese der operierten Tiere durch Vpr. in gleicher Weise beeinflußt wurde wie bei Gegenwart von 2 intakten Nieren, obwohl die absolute Größe der Diurese jetzt niedriger lag als bei normalen Tieren (Tab. 2) und sich z. B. nicht signifikant von der Diurese normaler Tiere nach Gabe von 0,6% NaCl (Tab. 1) unterschied. Nach Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung bewirkten bei den subtotal nephrektomierten Tieren schon 10 mE Vpr. eine Steigerung der Diurese auf mehr als das Doppelte des Kontrollwertes.

Nach dreistündigem oder längerem Durst zeigte Vpr. weder eine fördernde noch eine hemmende Wirkung auf die Diurese. Bei eintretendem Durstzustand hatte Vpr. noch eine signifikante antidiuretische Wirkung, die aber ausblieb, wenn den Tieren bis zum Beginn des Durstens nicht Wasser und 0,9%ige NaCl-Lösung, sondern nur die letztere angeboten wurde (Tab. 3).

2. Ausscheidung von Natrium

Über den Einfluß von Vpr. auf die Natriumausscheidung „gewässerter" Tiere innerhalb von 1½ Std nach der Injektion unterrichtet Tab. 4.

Bei der Mehrzahl der Versuchsgruppen ließ sich eine Steigerung der Na^+-Ausscheidung erst nach 100 mE Vpr./Ratte nachweisen. Unter dem Einfluß kleiner Vpr.-Dosen wurde die Na^+-Ausscheidung meist nicht signifikant gesteigert, ja, nach Wässerung mit 0,3%iger NaCl-Lösung sogar verringert. Die unter der Einwirkung von Vpr. ausgeschiedene Na^+-Menge war bei unbehandelten Kontrolltieren der ausgeschiedenen Wassermenge (signifikant) schwach *negativ* korreliert. Dagegen bestand

Tabelle 3. *Wasserausscheidung durstender Ratten nach Injektion verschiedener Vpr.-Dosen Injektion. Mittelwerte ± Standardabweichungen der Mittelwerte* ($s_{\bar{x}}$). (Bezeichnung der statistisch

Trinkflüssigkeit bis Beginn des Durstens	Dauer des Durstens bei Injektion Std	Kontrollen	Vasopressin mE/Ratte s. c.		
			0,47	0,94	1,88
Wasser + 0,9% NaCl	24	100 ± 25,5 (8)			
	9	100 ± 80,0 (8)			
	0	100 ± 6,5 (63)	131,5 ± 37,5 (8)	33,7+ ± 14,4 (8)	88,4 ± 14,4 (
0,9% NaCl	0	100 ± 33,3 (8)			

eine signifikante *positive* Korrelation zwischen Na^+- und Wasserausscheidungen bei denjenigen mit Vpr. behandelten Versuchsgruppen, bei denen deutliche *diuretische* Vpr.-Wirkungen festgestellt wurden.

Eindeutiger schien dagegen immer der Einfluß von Vpr. auf die *Konzentration* von Na^+ im Harn, der in Abb. 3 wiedergegeben ist. Die Na^+-Konzentrationen wurden meist schon von 10—30 mE/Ratte Vpr. gesteigert, soweit sie nicht wie bei Wässerung mit 1,8% NaCl-Lösung schon bei den Kontrollen nahe an der anscheinend kritischen oberen Grenze von etwa 20 mÄqu-% lagen. Hervorgehoben werden muß im übrigen, daß die Streuungen der Werte für die Na^+-Konzentrationen innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen immer geringer waren als die Streuungen der Na^+-*Ausscheidungen.*

Der Verlust großer Teile des Nierenparenchyms führt zu einer signifikanten Herabsetzung der Na^+-Konzentration im Harn sowie der Na^+-Ausscheidung (Tab. 5).

Unter der Einwirkung von Vpr. (50 mE) stiegen die Konzentrationen auf die bei intakten unbehandelten Tieren beobachteten Werte an, konnten aber nicht darüberhinaus gesteigert werden. Wie bei intakten Tieren

Tabelle 4. *Natriumausscheidung in mÄqu/90 min/Ratte bei Wässerung mit Wasser und Na* In Klammern Versuchszahl für jede Gruppe. Bezeichnung der Signifikanzen der Unterschi ausscheidung: Na^+-Ausscheidung in 90 min.

Wässerung mit	Per os gegebene Na^+-Menge mÄqu/Ratte	Kontrollen	Vasopressin mE/Ratte s. c.	
			1	10
H_2O	0	0,075 ± 0,013 (13)	0,099 ± 0,024 (13)	0,081 ± 0,022 (
0,3% NaCl	0,769	0,154 ± 0,033 (6)	0,046+ ± 0,012 (6)	0,046+ ± 0,012
0,6% NaCl	1,436	0,515 ± 0,135 (6)	0,473 ± 0,062 (6)	0,428 ± 0,062
0,9% NaCl	1,846	0,589 ± 0,086 (11)	0,472 ± 0,099 (12)	0,540 ± 0,063 (
1,8% NaCl	3,692	0,665 ± 0,122 (6)	1,366+ ± 0,265 (4)	0,789 ± 0,139
r		0,33		
P		< 0,05		

ozent der Mittelwerte der Kontrollgruppe vom gleichen Tage während der ersten 3 Std nach der gnifikanzen der Unterschiede gegenüber unbehandelten Kontrollgruppen wie bei Tab. 1)

Vasopressin mE/Ratte s. c.				
3,75	7,5	15	60	125
			117,8 ± 21,6 (8)	
			86,8 ± 33,3 (8)	
),1++ ± 9,3 (16)	16,3++ ± 5,8 (8)	20,6++ ± 4,2 (16)		16,2++ ± 5,4 (5)
,3 ± 17,8 (8)		60,0 ± 17,8 (8)		100,7 ± 26,7 (8)

nimmt auch bei den mit 0,9% NaCl-Lösung gewässerten Ratten die Na^+-Ausscheidung mit der Diurese zu.

Bei durstenden Ratten wurden im Harn Na^+-Konzentrationen gefunden, die in der gleichen Höhe lagen wie bei mit 0,9—1,8%iger NaCl-Lösung gewässerten Tieren. Hervorgehoben werden muß, daß die im Durst erreichten Na^+-Konzentrationen signifikant niedriger lagen als die bei mit isotonischen oder hypotonischen Salzlösungen gewässerten Tieren unter der Einwirkung von 10 mE Vpr. erreichten. Im Durst gelang es *nicht*, die Na^+-Ausscheidung im Harn durch injiziertes Vpr. zu steigern (Tab. 6).

Es ist allerdings möglich, daß eine sehr kurz dauernde geringfügige Steigerung der Na^+-Ausscheidung durch die notwendigen längeren Harnsammelperioden verschleiert wird.

3. Ausscheidung von Chloriden

Ein Vergleich der Abb. 3 und 4 sowie der Tab. 4 und 7 zeigt, daß die Cl'-Konzentration und Ausscheidung im Harn unter gleichen Bedingungen immer höher liegen als die entsprechenden Werte für Na^+. Der Unterschied

ösungen verschiedener Konzentrationen unter der Einwirkung von Vpr. Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. gegenüber unbehandelten Tieren wie in Tab. 1. — r = Korrelationskoeffizient Wasser- Wahrscheinlichkeit der Zufallsbedingtheit von r)

Vasopressin mE/Ratte s. c.			Korrelationskoeffizient Wasserausscheidung: Na^+-Ausscheidung in 90 min	Wahrscheinlichkeit der Zufallsbedingtheit von r P
30	50	100		
205+ ± 0,071 (8)	0,145 ± 0,043 (8)	0,403+++ ± 0,084 (5)	— 0,003	> 0,10
076 ± 0,020 (6)		0,273 ± 0,142 (6)	+ 0,32	> 0,05
335 ± 0,123 (6)		0,605++ ± 0,065 (6)	+ 0,67	< 0,01
	0,493 ± 0,045 (6)	1,117++ ± 0,145 (5)	+ 0,90	< 0,01
822 ± 0,099 (6)		1,051 ± 0,167	+ 0,24	> 0,05

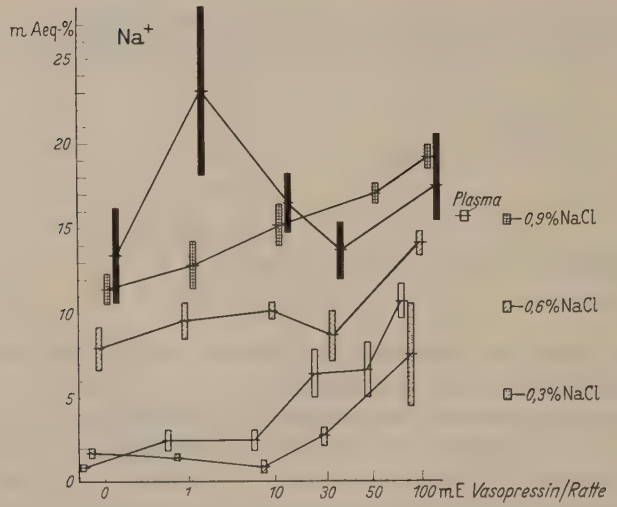


Abb. 3. Einfluß von Vpr. auf die Na^+-Konzentration im Harn von mit verschieden konzentrierten NaCl-Lösungen gewässerten Ratten. Harn der auf die Injektion folgenden 90 min. Ordinate: Konzentrationen in mÄqu/100 ml Harn; Abszisse: Vpr.-Dosen. Erklärung der Felder wie in Abb. 1. — Zum Vergleich sind die Konzentrationen der gegebenen Wässerungsflüssigkeiten sowie die Na^+-Konzentration im Plasma von 16 unbehandelten Ratten der gleichen Gruppen (Plasmakonzentration: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) am rechten Rand angegeben

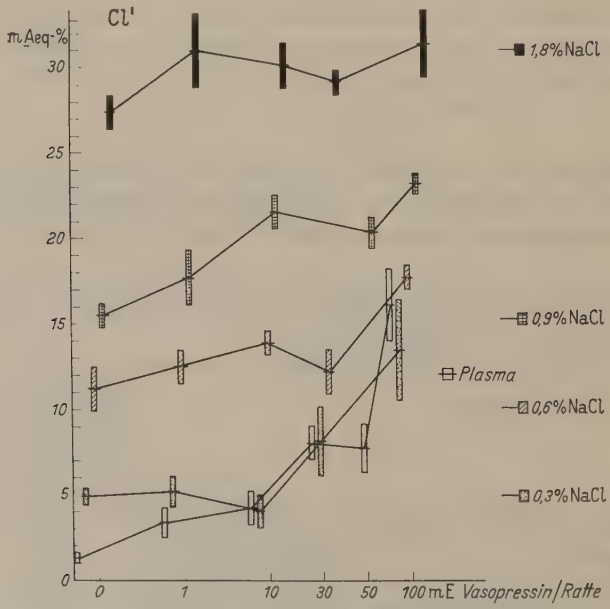


Abb. 4. Einfluß von Vpr. auf die Cl'-Konzentration im Harn mit NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration gewässerter Ratten. Harn der auf die Injektion folgenden 90 min Ordinate: Cl'-Konzentration in mÄqu-%; Abszisse: Vpr.-Dosen in mE/Ratte s.c. Bezeichnung der Felder wie in Abb. 1 und 3. Vergleichswerte am rechten Rand wie in Abb. 3

tritt besonders stark nach Gabe der konzentrierteren Salzlösungen oder nach höheren Vpr.-Dosen in Erscheinung, weil anscheinend die Cl′-Konzentration im Harn im Gegensatz zur Na^+-Konzentration auf Werte um 30 mÄqu-% und vielleicht darüber gesteigert werden kann. Die Cl′-Konzentrationen und -Ausscheidungen liegen dagegen immer niedriger als die entsprechenden Werte für die Summe von Na^+ und K^+.

Im Unterschied zu den Verhältnissen bei der renalen Na^+-Ausscheidung war die Cl′-Konzentration im Harn nach ausgedehnten Nierenparenchym-Resektionen nicht signifikant niedriger als bei intakten Tieren nach gleichartiger Wässerung; die Cl′-Ausscheidung war entsprechend der geringeren Diurese bei gleicher Konzentration etwas kleiner. Vpr. wirkte auf die Cl′-Konzentrationen und -Ausscheidungen im gleichen Sinn aber weniger stark als bei normalen Tieren (Tab. 8).

Ebensowenig wie die Na^+-Ausscheidung ließ sich die Cl′-Ausscheidung *durstender* Ratten durch Vpr. steigern (Tab. 9). Auch hier lagen die Konzentrationen *niedriger* als die bei mit Salzwassergewässerten Tieren unter der Einwirkung von Vpr. erzielten.

Tabelle 5. *Einfluß von Vpr. auf Na^+-Konzentration im Harn (mÄqu-%) und Na^+-Ausscheidung in 90 min (mÄqu/Ratte/90 min; Kursivzahlen) intakter und subtotal nephrektomierter Ratten.*
(Bezeichnung der Signifikanz der Unterschiede zwischen unbehandelten und Vpr.-behandelten Gruppen wie in Tab. 1. — P_1 = Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung der Werte bei intakten und subtotal nephrektomierten Tieren)

Wässerung mit	Vorbehandlung	Unbehandelte Kontrollen	P_1	Vasopressin mE/Ratte s. c. 1	Vasopressin mE/Ratte s. c. 10	Vasopressin mE/Ratte s. c. 50
H_2O	Subtotale Nephrektomie	0,32 ± 0,08 (5) *0,020 ± 0,005* (5)	< 0,05 < 0,05	0,93 ± 0,57 (3) *0,022 ± 0,013* (3)	0,36 ± 0,15 (4) *0,006 ± 0,002* (4)	0,93+ ± 0,26 (4) *0,012 ± 0,005* (4)
	Intakte Tiere	0,79 ± 0,13 (13) *0,075 ± 0,013* (13)		2,47+ ± 0,60 (13) *0,099 ± 0,024* (13)	2,46+ ± 0,55 (13) *0,081 ± 0,022* (13)	6,59++ ± 1,46 (8) *0,145 ± 0,043* (8)
0,9%NaCl	Subtotale Nephrektomie	6,40 ± 1,30 (4) *0,114 ± 0,013* (4)	< 0,01 < 0,01	7,90 ± 1,07 (4) *0,226+ ± 0,033* (4)	8,30 ± 1,65 (4) *0,286 ± 0,083* (4)	11,30+ ± 1,27 (4) *0,264 ± 0,072* (4)
	Intakte Tiere	11,44 ± 0,85 (11) *0,589 ± 0,086* (11)		12,76 ± 1,35 (12) *0,472 ± 0,079* (12)	15,08+ ± 1,21 (10) *0,540 ± 0,063* (10)	16,90++ ± 0,62 (6) *0,493+ ± 0,045* (6)

Tabelle 6. *Wirkung von Vpr. auf die Na^+-Ausscheidung durstender Ratten. Werte entzug.* (Zeichen und

	Kontrollen	Vasopressin mE/Ratte s. c.	
		0,47	0,94
mÄqu-% . . .	10,55 ± 0,53 (56)	9,94 ± 1,08 (8)	11,99 ± 0,69 (16)
mÄqu/Ratte/Std	*0,037 ± 0,003* (56)	*0,042 ± 0,005* (8)	*0,041 ± 0,006* (16)

4. Ausscheidung von Kalium

Über die Harn-Konzentrationen und -Ausscheidungen von K^+ bei verschieden großer NaCl-Belastung bei gewässerten Tieren unterrichtet Tab. 10.

Es ergibt sich vor allem, daß die K^+-Konzentrationen sowie die Ausscheidungen bei den unbehandelten, wie auch bei den Vpr.-behandelten Ratten mit steigender oder fallender Na^+-Konzentration oder -Ausscheidung steigen oder fallen. Der Korrelationskoeffizient zwischen K^+- und Na^+-Konzentrationen (und daher natürlich auch Ausscheidungen) beträgt bei unbehandelten Ratten $r = 0{,}68$ ($n = 41$; $P < 0{,}01$); bei Kontrollen und Vpr.-Ratten zusammen hat er den nicht signifikant niedrigeren Wert $r = 0{,}55$ ($n = 188$; $P < 0{,}01$). Da in den Versuchen nur das Na^+-Angebot, nicht aber das K^+-Angebot variiert wurde, lassen sich die Abhängigkeiten der K^+-Ausscheidung und -Konzentration im Harn von den Na^+-Werten auch als Regressionsgleichung wiedergeben, wenn man von der Forderung abgeht, daß in einer Regressionsgleichung die Werte der unabhängigen Variablen ohne Streuung gemessen sein sollen. Die Regressionsgleichung lautet:

$$\hat{Y} = 1{,}066 + 0{,}156\, x$$

($Y = K^+$-Konzentration, $x = Na^+$-Konzentration).

Die Regression ist berechtigt, da $F = 79{,}0$ ($P < 0{,}001$). Ebenso läßt sich die Größe der K^+-Ausscheidung — in statistisch einwandfreier Form — als Funktion der per os zugeführten NaCl-Menge darstellen:

$$\hat{Y} = 0{,}015 + 0{,}065\, x.$$

($Y = K^+$-Ausscheidung in mÄqu/Ratte/90 min; $x =$ Per os gegebene Na^+-Menge in mÄqu/Ratte).

Die Regression ist berechtigt, da $F = 75{,}8$ ($P < 0{,}001$).

Der Vollständigkeit halber muß aber bemerkt werden, daß sich die Größe der K^+-Ausscheidung ebensogut als Funktion der Größe der Cl'-Ausscheidung darstellen läßt.

Bei den subtotal nephrektomierten Ratten war die K^+-Konzentration und -Ausscheidung im Harn in gleicher Weise von der Na^+-Ausscheidung abhängig wie bei normalen Ratten: Eine Wiedergabe der Einzelwerte erübrigt sich deshalb.

errechnet aus 9 Std-Harnsammelperioden. Injektion gleichzeitig mit Trinkflüssigkeits-
Bezeichnungen wie in Tab. 1)

Vasopressin mE/Ratte s. c.			
1,88	3,75	7,5	15,0
10,66 ± 0,77 (8)	11,11 ± 1,05 (16)	9,73 ± 0,55 (8)	10,77 ± 0,74 (16)
0,041 ± 0,005 (8)	*0,047 ± 0,006* (16)	*0,033 ± 0,004* (8)	*0,038 ± 0,004* (16)

Die K^+-Konzentration im Harn von durstenden Ratten lag etwas höher als die höchsten mit oder ohne Vpr.-Injektion unter unseren Versuchsbedingungen beobachteten Werte. Sie betrug bei beginnendem Durst 6,52 ± 0,48 mÄqu-% (56 Tiere), nach 3stündigem Dursten 5,79 ± 0,90 mÄqu-% (16 Tiere), nach 6stündigem Dursten 6,74 ± 1,81 mÄqu-% (8 Tiere), und nach 24stündigem Dursten 6,51 ± 0,98 mÄqu-% (16 Tiere), jeweils im Harn der folgenden 3 Std. Durch Vpr. wurden die K^+-Konzentrationen und -Ausscheidungen im Harn bei durstenden Tieren *nicht* beeinflußt.

5. Titrationsacidität des Harns und Ausscheidung von NH_4^+-Ionen

Die geringen Titrationsaciditäten bei gewässerten Ratten, die zudem stark streuten, wurden weder vom Salzgehalt der Wässerungsflüssigkeit, noch durch Vpr. eindeutig beeinflußt.

Bei durstenden Ratten war die renale Säurebildung sehr viel stärker. Ausgeschieden wurden in der 1.—9. Std des Durstens 0,033 ± 0,003 mÄqu/Ratte/Std $H^+ + NH_4^+$ (56 Tiere); die Konzentration im Harn lag bei 10,55 ± 0,86 mÄqu-% (56 Tiere). Vpr. hatte auf die Säure- und Ammoniumionen-Ausscheidung keinen Einfluß. Hervorgehoben werden soll die Konstanz der Gesamt-H^+-Ionen-Sekretion (Ausscheidung von $H^+ + NH_4^+$) bei Veränderungen der Diurese, die u. a. auch darin ihren Ausdruck findet, daß hier die Ausscheidungen/Ratte/Zeiteinheit immer eine wesentlich geringere Streuung aufweisen als die Konzentrationen im Harn.

Es erscheint unter unseren Versuchsbedingungen gerechtfertigt, die Summe der ausgeschiedenen H^+- und NH_4^+-Ionen als Maß der renalen Säuresekretion zu betrachten, obwohl bei der Ratte im Gegensatz zum Hund und Mensch die NH_4^+-Ausscheidung stärker von der Stoffwechsellage als vom p_H des Harns beeinflußt wird (E. Leonard u. Mitarb. 1955). Unter den gewählten Versuchsbedingungen war mit Unterschieden in der Stoffwechsellage zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen nicht zu rechnen; andererseits wiesen Titrationsacidität und NH_4^+-Ausscheidung stets gleichsinnige Veränderungen auf. Die Summe von NH_4^+ und H^+-Ionenausscheidung zeigte geringere Streuungen als die Ausscheidungen von H^+ oder NH_4^+ für sich allein.

Tabelle 7. *Cl'-Ausscheidung bei Wässerung mit Wasser und NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen unter der Einwirkung von Vpr. Zahlenangaben in mÄqu/Ratte/90 min. Mittelwerte* $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.
(In Klammern Versuchszahlen für jede Gruppe. Bezeichnung der Signifikanz der Unterschiede gegenüber unbehandelten Tieren wie in Tab. 1)

Wässerung mit	Per os gegebene Cl' mÄqu/Ratte	Kontrollen	Vasopressin mE/Ratte s. c.									
			1 mE		10 mE		30 mE		50 mE		100 mE	
H_2O	—	0,196 ± 0,066 (13)	0,128 ± 0,030	(13)	0,144 ± 0,042	(13)	0,252+ ± 0,060	(8)	0,168 ± 0,043	(8)	0,576+	± 0,081 (5)
0,3% NaCl	0,769	0,318 ± 0,048 (6)	0,213 ± 0,047	(6)	0,164 ± 0,083	(6)	0,229	± 0,067 (6)	—		0,421	± 0,177 (6)
0,6% NaCl	1,436	0,722 ± 0,141 (6)	0,663 ± 0,061	(6)	0,582 ± 0,072	(6)	0,470	± 0,058 (6)	—		0,761	± 0,077 (6)
0,9% NaCl	1,846	0,738 ± 0,078 (10)	0,628 ± 0,100	(11)	0,745 ± 0,065	(9)	—		0,623 ± 0,063	(6)	1,547+++	± 0,170 (4)
1,8% NaCl	3,692	1,548 ± 0,240 (6)	1,840 ± 0,077	(4)	1,458 ± 0,172	(6)	1,738	± 0,146 (6)	—		1,859	± 0,152 (6)

Diskussion

Die Geschwindigkeit der Diurese nach oralen Wassergaben wird bei der Ratte durch den Salzgehalt der Wässerungsflüssigkeit bestimmt: Bis zu einer NaCl-Konzentration von 0,9% wird die Diurese immer langsamer, um bei weiterer Steigerung der NaCl-Konzentration mit Eintritt der „osmotischen Diurese" wieder schneller zu werden (W. R. Bristol, V. A. Drill 1952). Da sich dieser Unterschied in unseren Versuchen 50 min nach der letzten Wassergabe nachweisen läßt, dürfte er kaum durch Verschiedenheiten der Resorptionsgeschwindigkeit der verschiedenen Salzlösungen zu erklären sein; denn die enterale Resorption soll bei den angewandten Salzkonzentrationen zu diesem Zeitpunkt beendet sein (E. F. Adolph, J. P. Northrop 1952). Andererseits besteht kein Anhalt für die Annahme, daß in diesem Konzentrationsbereich durch den Salzgehalt der hypo- bis isotonischen Lösungen Ausschüttungen von Vpr. verursacht werden könnten.

Die beobachtete Verringerung bzw. Aufhebung der antidiuretischen Vpr.-Wirkung mit steigendem Salzgehalt der Wässerungsflüssigkeit läßt sich aber nicht als Folge der geringeren Diuresegeschwindigkeiten der mit 0,6 bis 1,8%iger NaCl-Lösung gewässerten unbehandelten Kontrolltiere erklären: Dagegen sprechen 1. die unveränderte antidiuretische Wirksamkeit von Vpr. bei den subtotal nephrektomierten, aber mit Wasser gewässerten Ratten, deren Kontrolldiuresen gleichfalls vermindert und nicht signifikant höher als z. B. diejenigen der mit 0,6%iger NaCl-Lösung gewässerten normalen Tiere waren. 2. Das Fehlen einer negativen Korrelation

zwischen der Diurese in den 30 min vor der Injektion von Vpr. und der (als Ausdruck der antidiuretischen Wirkung gewählten) Diurese in der 20.—50. min nach der Vpr.-Injektion. Eine signifikante negative Korrelation müßte man erwarten, wenn eine geringere Diurese mit einer geringeren antidiuretischen Wirksamkeit von Vpr. gleichzusetzen wäre. 3. Die Tatsache, daß zur Standardisierung von Vpr.-Präparaten nach ihrer antidiuretischen Wirkung (nach Gabe von Wasser oder 0,2%iger Salzlösung) an Ratten häufig Flüssigkeitsmengen benutzt werden, bei denen die Kontrolldiuresen langsamer sind als unter unseren Versuchsbedingungen bei den mit 0,6—1,8%iger NaCl-Lösung gewässerten Tieren (Ham 1943).

Es sei erwähnt, daß auch eine Verringerung der Geschwindigkeit der Wasserdiurese durch andere Eingriffe — wie z. B. Thiaminmangel bei der Ratte (K. Guggenheim 1954) oder die Herabsetzung der Bluteiweißkonzentration durch Plasmaaustausch beim Hund (J. S. Schweppe, S. Freemann 1947) — nicht zu einer Verringerung der antidiuretischen Vpr.-Wirkung führt.

Tabelle 8. *Einfluß von Vpr. auf Cl^--Konzentration im Harn (mÄqu-%) und Cl^--Ausscheidung in 90 min (mÄqu/Ratte/90 min; Kursivzahlen) intakter und subtotal nephrektomierter Ratten. Angegeben sind Mittelwerte $x \pm s_{\bar{x}}$.* (Signifikanz der Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen wie in Tab. 5)

Wässerung mit	Vorbehandlung	Unbehandelte Kontrollen	Vasopressin mE/Ratte s. c. 1	10	30	50
H_2O	Subtotale Nephrektomie	0,57 ± 0,24 (5)	1,76 ± 0,80 (3)	2,33++ ± 0,27 (4)	3,20 ± 1,11 (4)	2,02 ± 0,75 (4)
		0,033 ± 0,013 (5)	*0,043 ± 0,020* (3)	*0,048 ± 0,019* (3)	*0,050 ± 0,021* (4)	*0,027 ± 0,010* (4)
	Intakte Tiere	1,34 ± 0,25 (13)	3,42+ ± 0,49 (13)	4,30++ ± 1,00 (13)	8,13+++ ± 1,03 (8)	7,78+++ ± 1,38 (8)
		0,196 ± 0,066 (13)	*0,128 ± 0,030* (13)	*0,144 ± 0,042* (13)	*0,252+ ± 0,060* (8)	*0,168 ± 0,043* (8)
0,9% NaCl	Subtotale Nephrektomie	14,40 ± 2,65 (4)	14,70 ± 1,90 (4)	13,70 ± 1,09 (4)		18,00 ± 0,25 (3)
		0,261 ± 0,026 (4)	*0,420 ± 0,173* (4)	*0,450 ± 0,089* (4)		*0,447 ± 0,142* (3)
	Intakte Tiere	15,49 ± 0,67 (10)	17,65 ± 1,59 (11)	21,46++ ± 0,95 (9)		21,30+++ ± 0,88 (6)
		0,738 ± 0,078 (10)	*0,628 ± 0,100* (11)	*0,745 ± 0,065* (9)		*0,623 ± 0,063* (6)

Tabelle 9. *Einfluß von Vpr. auf die Cl'-Ausscheidung durstender Ratten. Konzenperioden von 9 Std.* (Zeichen

	Kontrollen	Vasopressin mE/Ratte s. c.	
		0,47	0,94
mÄqu-%	16,30 ± 0,78 (56)	16,78 ± 1,73 (8)	18,14 ± 0,92 (16)
mÄqu/Ratte/Std	*0,054* ± *0,004* (56)	*0,071*+ ± *0,007* (8)	*0,058* ± *0,007* (16)

Die Herabsetzung, Aufhebung oder sogar Umkehr der antidiuretischen Vpr.-Wirkung mit steigendem NaCl-Gehalt der Wässerungsflüssigkeit, die unter anderen Bedingungen von W. H. Sawyer (1952) schon bei geringeren Salzkonzentrationen als in unseren Versuchen beobachtet wurde, muß somit als Folge des Ansteigens der NaCl-Konzentration der Körperflüssigkeiten angesehen werden. Ein Anstieg der NaCl-Konzentration im extracellulären Raum ist aber auch einer der physiologischen Reize für die Ausschüttung von Hypophysenhinterlappenhormonen (E. B. Verney 1929, 1936, 1946; A. Gilman, L. Goodman 1947; W. L. Lipschitz, E. Stokey 1947). Es liegt auf der Hand, daß sich diese Wirkungsabnahme bzw. -umkehr nur schwer mit der Vorstellung (L. Goodman, A. Gilman 1941) vereinbaren läßt, daß die Herabsetzung der Wasserausscheidung im Durst auf dem Umweg über eine primäre Zunahme der NaCl-Konzentration und damit des wirksamen osmotischen Drucks in der Extracellulärflüssigkeit und die dadurch veranlaßte Vpr.-Ausschüttung aus dem HHL zustandekommt. Vpr.-Ausschüttung wurde ja unseres Wissens nur nach Gabe stark hypertonischer Salzlösungen nachgewiesen (A. Gilman u. L. Goodman 1937); W. L. Lipschitz, E. Stokey 1947), die gleichzeitig eine osmotische (und durch Vpr. nicht hemmbare) Diurese verursachen. Wenn sich nun ergibt, daß schon bei oraler Gabe von isotonischer NaCl-Lösung — also in dem Bereich, in dem die Vpr.-Ausschüttung einsetzen könnte — die antidiuretische Vpr.-Wirkung praktisch eliminiert ist, so muß daraus gefolgert werden, daß das im Durst ausgeschüttete Vpr. — zumindest bei der Ratte — keinen wesentlichen Beitrag zur Erhaltung des Körperwasserbestandes leisten kann. Im gleichen Sinn spricht die absolute Größe der Diurese durstender Ratten (Tab. 3), die niedriger liegt als die niedrigsten unter der Einwirkung von Vpr. erreichbaren Werte bei Tieren, die 0,6%ige oder konzentriertere Salzlösung erhalten hatten (Abb. 1 u. Tab. 1): Die im Durst beobachtete Verringerung der Harnmenge läßt sich daher wohl nicht durch die Einwirkung von Vpr. allein erklären.

Die bei Beginn des Durstzustandes — und nur bei Ratten, die bis dahin Wasser *und* 0,9%ige NaCl-Lösung ad libitum erhalten hatten — beobachtete weitere inkonstante Hemmung der an sich schon sehr niedrigen Diuresen durch Vpr. läßt sich unseres Erachtens nicht als Argument für die Rolle von Vpr. bei der Diuresehemmung im Durst heranziehen.

tration in mÄqu-%; Ausscheidung in mÄqu/Ratte/Std. Werte aus Harnsammel- und Bezeichnung wie in Tab. 6)

Vasopressin mE/Ratte s. c.			
1,88	3,75	7,50	15,0
16,63 ± 1,19 (8)	17,13 ± 0,84 (16)	15,82 ± 1,02 (8)	17,96 ± 1,50 (16)
0,063 ± 0,007 (8)	*0,068 ± 0,005* (16)	*0,052 ± 0,004* (8)	*0,060 ± 0,005* (16)

Sie muß wohl vielmehr so gedeutet werden, daß auch die zu Beginn des Durstens (auf anderem Weg) verlangsamte Diurese unter Umständen noch den Typ einer Wasserdiurese aufweisen und daher durch Vpr. hemmbar sein kann.

Bei subtotal nephrektomierten Ratten nimmt nach R. Platt (1952) die Harnausscheidung den Charakter einer osmotischen Diurese an. Unter diesen Umständen erscheint die diuretische Wirkung von Vpr. bei Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung gut verständlich. Bei der osmotischen Diurese ist ja die Harnmenge direkt von der Anzahl der pro Zeiteinheit durch die Tubuli in den Endharn gelangenden osmotisch wirksamen Teilchen ("urinary osmotic load") abhängig, die infolge der Steigerung der Na^+- (und Cl'-) Ausscheidung durch Vpr. um die zusätzlich ausgeschiedene Salzmenge vergrößert würde. Besonders interessant erscheint nun die Feststellung, daß nach oraler Gabe von Wasser die Diurese dieser Tiere noch den Charakter einer Vpr.-hemmbaren Wasserdiurese annehmen kann.

R. Platt (1952) hat ja bekanntlich das Auftreten einer normalen Spontandiurese nach großen Nierenparenchymresektionen (und entsprechender Verringerung des Glomerulumfiltrats/Zeiteinheit) als Argument für die Annahme einer tubulären Wassersekretion gedeutet, weil ohne diese Annahme mit unvorstellbar hohen osmotischen Konzentrationen der tubulär rückresorbierten Flüssigkeit gerechnet werden müßte. Die Auslösbarkeit einer echten Wasserdiurese nach großen Nierenparenchymresekretionen kann als weitere Stütze dieser Argumentation gedeutet werden. — Wenn es zutrifft, daß nach Herabsetzung des Glomerulumfiltrats durch Nierenparenchymresektionen eine wesentliche tubuläre Wassersekretion auftritt, so würde deren Hemmbarkeit durch Vpr. mit den herrschenden Vorstellungen über den Mechanismus der antidiuretischen Vpr.-Wirkung unvereinbar erscheinen.

Die in unseren Versuchen injizierten Vpr.-Dosen lagen größenordnungsmäßig im Bereich der physiologischen Ausschüttung bei Gabe hypertonischer Salzlösungen oder beim Durst. Nach W. L. Lipschitz u. E. Stokey scheiden Ratten unter diesen Bedingungen 2—3 mE/Ratte (200 g KG)/Std im Harn aus, was bei Annahme von etwa 7% Ausscheidung im Harn (M. Ginsburg, H. Heller 1953) einer Ausschüttung von 28—43 mE/Ratte im gleichen Zeitraum entspräche. Daß bei denjenigen Tieren, die 0,6—0,9%ige NaCl-Lösung erhielten, schon vor der Vpr.-Injektion eine hinreichend große endogene Vpr.-Ausschüttung bestanden haben könnte, um die Wirkung zusätzlich injizierten antidiuretischen

Tabelle 10. *K^+-Konzentrationen (mÄqu/100 ml Harn) und -Ausscheidungen in 90 min (mÄqu/Ratte in 90 min; Kursivzahlen) von Ratten nach Wässerung mit Wasser oder NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen und nach s. c. Injektion von Vpr. Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.* (In Klammern Versuchszahlen für jede Gruppe. Signifikanz der Unterschiede zwischen Vpr.-behandelten und unbehandelten Gruppen wie in Tab. 1)

Wässerung mit	Per os gegebene *NaCl*-Menge mÄqu/Ratte	Kontrollen	Vasopressin mE/Ratte s. c. 1	10	30	50	100
H_2O	—	0,21 ±0,04 (13) *0,019±0,003* (13)	0,43 ±0,14 (13) *0,015±0,002* (13)	0,58+±0,10 (13) *0,018±0,003* (13)	2,33++ ±0,60 (7) *0,054++±0,010* (7)	2,18++±0,38 (8) *0,042+±0,007* (8)	0,79++±0,18 (5) *0,025 ±0,003* (5)
0,3% NaCl	0,769	1,67 ±0,38 (6) *0,107±0,028* (6)	1,45 ±0,58 (6) *0,061±0,026* (6)	0,99 ±0,52 (6) *0,045±0,035* (6)	4,12++ ±0,38 (6) *0,112 ±0,020* (6)		3,99+ ±0,82 (6) *0,102 ±0,040* (6)
0,6% NaCl	1,436	1,19 ±0,30 (6) *0,056±0,020* (6)	1,98 ±0,46 (6) *0,195±0,104* (6)	1,80 ±0,49 (6) *0,066±0,015* (6)	1,48 ±0,21 (6) *0,056 ±0,006* (6)		1,86+ ±0,29 (6) *0,081 ±0,015* (6)
0,9% NaCl	1,846	2,74 ±0,28 (11) *0,124±0,009* (11)	3,46 ±0,60 (12) *0,104±0,015* (12)	3,62+ ±0,37 (10) *0,112±0,009* (10)		4,43 ±0,51 (6) *0,126 ±0,010* (6)	2,40 ±0,008 (5) *0,142 ±0,018* (5)
1,8% NaCl	3,692	4,98 ±0,39 (6) *0,278±0,044* (6)	5,70 ±0,86 (4) *0,337±0,035* (4)	5,53 ±0,50 (6) *0,294±0,056* (6)	4,85 ±0,37 (6) *0,295 ±0,027* (6)		5,28 ±0,50 (6) *0,349 ±0,041* (6)

Hormons nicht mehr in Erscheinung treten zu lassen, ist unwahrscheinlich (s. o. S. 450). Eher wäre es möglich, das Fehlen der antidiuretischen Vpr.-Wirkung bei durstenden Ratten (Tab. 3) auf dieser Grundlage zu erklären: Die Beobachtungen an der Salzausscheidung dieser Tiere (s. u.) sprechen aber gegen eine derartige Deutung.

Schließlich sei darauf hingewiesen, daß nach allen bisher vorliegenden Beobachtungen anscheinend auch beim Durst (H. Heller 1955; V. C. Abrahams u. M. Pickford 1954) immer mehr Oxytocin als Vasopressin ausgeschüttet wird und daß Oxytocin unter diesen Umständen bei der Ratte diuretisch wirkt (A. M. Fraser 1937, 1942; G. Kuschinsky, H. E. Bundschuh 1939; H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956a).

Ein Blick auf Abb. 3 zeigt, daß nach Gabe von isotonischer Salzlösung die Na^+-Konzentration im Harn hinter derjenigen der oral gegebenen Lösung zurückbleibt oder — mit anderen Worten, daß unter den Bedingungen des akuten Versuchs die Ausscheidung von zusätzlich gegebenem Na^+ etwas langsamer als die des zusätzlich gegebenen Wassers erfolgt, während die

Ausscheidung von Cl′ (Abb. 4) auch bei Gabe mäßig hypertonischer Salzlösung noch der des Wassers zu folgen vermag. Die Ratte verhält sich also in dieser Beziehung im akuten wie im chronischen (R. H. Kellogg, W. E. Burack, K. J. Isselbacher 1954) Versuch ähnlich wie der Hund, bei dem auf die Zufuhr von isotonischer NaCl-Lösung eine „isotonische Salzdiurese" (A. A. Chanutin, H. Smith, L. B. Mendel 1924) folgt — und anders als der Mensch, bei dem isotonische Salzlösung überhaupt nur bei Anwendung besonderer Kunstgriffe (M. Ladd 1951, J. D. Rosenbaum u. Mitarb. 1953) eine Diurese auslöst, die dann aber in der Ausscheidung eines hypotonischen extrem salzarmen Harns besteht.

Vasopressin steigert unterhalb einer Maximalkonzentration, die für Na^+ um 20 mÄqu-%, für Cl′ um 30 mÄqu-% oder darüber liegt, regelmäßig in linearer Abhängigkeit vom log Dosis (Abb. 3 und 4) die Konzentration von Na^+ und Cl′ im Harn unabhängig von seiner gleichzeitigen hemmenden, fehlenden oder fördernden Wirkung auf die Diurese. Ob diese Steigerung der Na^+ oder Cl′-Konzentration auch mit einer Steigerung der Ausscheidung in der Zeiteinheit einhergeht, hängt im wesentlichen von der Art der Beeinflussung der Diurese ab. Immerhin bewirken größere Vpr.-Dosen (Abb. 4 und 7) in den meisten Versuchen eindeutige Steigerungen der Na^+ und auch Cl′-Ausscheidung.

Dieser Befund steht im Widerspruch zu einer Feststellung von O. Schaumann (1949), der nach s. c. Injektion von 40 mE/100 g Körpergewicht bei mäßiger Wasserdiurese an Ratten im innerhalb von 4 oder 8 Std nach der Injektion gesammelten Harn keine Steigerung der Na^+- und Cl′-Ausscheidung fand. Der Widerspruch dürfte sich wahrscheinlich dadurch erklären, daß die Wirkung von Vpr. auf die renale Salzausscheidung bei der Ratte wie beim Hund (H. J. Karvonen, V. Leppänen, M. E. Pitkänen 1953) nur von kurzer Dauer ist und deshalb in über mehrere Stunden gesammelten Harnproben nicht festgestellt werden kann; auch die antidiuretische Vpr.-Wirkung bei der Wasserdiurese erscheint aus dem gleichen Grund in den von Schaumann (1949) angegebenen Zahlen recht geringfügig. In unseren Versuchen an durstenden Ratten tritt die Wirkung von Vpr. auf die Salzausscheidung wegen der erforderlichen längeren Sammelperioden gleichfalls nicht in Erscheinung.

Die Feststellung, daß Vpr. die Na^+- und Cl′-Konzentrationen im Harn steigert, beinhaltet die unbewiesene Hypothese, daß in den Nieren Wasser- und Salzausscheidung bzw. Rückresorption so aufeinander abgestimmt werden, daß jeweils eine bestimmte Na^+- oder Cl′-Konzentration eingestellt wird — und daß Vpr. den Einstellungsspiegel dieses Mechanismus verändert. Diese Hypothese kann durch die Formulierung umgangen werden, daß Vpr. die Na^+- und Cl′-Ausscheidung steigert, daß aber diese Ausscheidungssteigerung nicht unabhängig von der Wasserausscheidung ist und dann ausbleibt, wenn die letztere durch Vpr. wesentlich vermindert wird. — Konzentrationen (und Ausscheidungen) von Na^+ und Cl′ waren in allen unseren Versuchen korreliert. Ein Anhalt für

die Annahme einer primären Beeinflussung der Na^+- (O. Schaumann 1949) oder der Cl′-Ausscheidung durch Vpr. läßt sich aus den Ergebnissen derartiger Versuche nicht gewinnen.

Dagegen ist es durchaus möglich, daß die diuretische Wirkung von Vpr. nach Gabe von iso- und hypertonischer NaCl-Lösung bei normalen Ratten — in ähnlicher Weise, wie das oben (S. 29) für nephrektomierte Ratten besprochen wurde — als Folge der gesteigerten Salzausscheidung und des dadurch gesteigerten osmotischen „load" für die Tubuli gedeutet werden kann (A. M. Fraser 1942). — Umgekehrt widersprechen aber unsere Ergebnisse — zumindest für die Species Ratte — der Annahme, daß die fördernde Wirkung von Vpr. auf die Na^+ und Cl′-Ausscheidung eine Folge seiner antidiuretischen Wirkung sei (A. Leaf, F. C. Bartter, R. F. Santos, O. Wrong 1953; J. O. Davis, D. S. Howell, R. E. Hyatt 1954).

Die direkte Abhängigkeit der K^+-Konzentration und -Ausscheidung im Harn von der Na^+-Konzentration und -Ausscheidung sowohl mit als auch ohne Gabe von Vpr. und sowohl bei gewässerten wie bei durstenden Tieren machen die Annahme einer direkten Beeinflussung der renalen K^+-Ausscheidung durch Vpr. (O. Schaumann 1949) überflüssig. Die Steigerung der K^+-Konzentration unter Vpr. kann als Folge der Steigerung der Na^+-Konzentration angesehen werden.

Auf die Gesamtausscheidung von H^+-Ionen in den Harn — d. h. die Summe der Titrationsacidität und NH_4^+-Ionen — hat Vpr. keinen Einfluß. Bemerkenswert ist die Konstanz dieser Ausscheidung bei Veränderungen der Diurese unter verschiedenen Einflüssen bei durstenden Ratten.

Summary

1. While vasopressin (vpr.) in doses of 1 to 100 mU per rat injected subcutaneously is markedly antidiuretic in rats hydrated with water or 0.3 per cent NaCl solution, this antidiuretic activity is either abolished or considerably diminished in animals hydrated with 0.6 to 0.9 per cent saline. In rats hydrated with hypertonic NaCl solutions, vpr. either increases diuresis or has no effect. All effects of vpr. on diuresis are of short duration.

2. Subtotal nephrectomy leaving intact one third or less of one kidney does not abolish water diuresis in rats. Water diuresis in subtotally nephrecomized animals is inhibited by vpr. to the same extent as in intact rats. In subtotally nephrectomized rats hydrated with isotonic saline vpr. has a stronger diuretic effect than in intact animals. The diuretic effect of vpr. may be due to its natriuretic and chloruretic activities.

3. Thirst results in a greater inhibition of diuresis than can be brought about by any dose of vpr. in rats hydrated with 0.3 to 1.8 per cent saline. During thirst vpr. has no demonstrable antidiuretic activity in rats,

unless they had access to tap water immediately before withdrawal of drinking fluid. — It therefore appears difficult to ascribe the inhibition of diuresis in thirsting rats to the effect of the secretion of vpr.

4. Vpr. causes an increase in the concentration of Na^+ and Cl' in the urine of rats hydrated either with water or with hypo- to isotonic saline. The relationship between log dose and urinary concentrations is linear up to maximum concentrations of approximately 200.0 mEq/l for sodium and of approximately 300.0 mEq/l for chloride. No such straight relationship exists between doses of vpr. and urinary excretions of Na^+ and Cl' per unit of time. — The concentrations of sodium and chloride found in the urine of rats during thirst are lower than should be expected under the influence of maximum secretion of endogenous vpr. caused by an increase of the concentration of salt in extracellular fluid. — Subtotal nephrectomy delays excretion of sodium and chloride to a larger extent than excretion of water in animals hydrated with 0.9 per cent saline.

5. The urinary excretion of potassium in untreated rats as well as under the influence of vpr. depends directly upon the excretion of sodium. Regression equations are given.

6. Vpr. has no influence on the titratable acidity and on the urinary excretion of ammonium ions.

Literatur

Abrahams, V. C., and M. Pickford: Simultaneous observations on the rate of urine flow and spontaneous uterine movements in the dog, and their relationship to posterior lobe activity. J. of Physiol. **126**, 320 (1954). — Adolph, E. F., and J. P. Northrop: Absorption of water and chloride (Rat). Amer. J. Physiol. **168**, 311 (1952). — Bristol, E. R., and V. A. Drill: Saline hydration and diuresis after andrenalectomy. Endocrinology (Springfield, Ill.) **50**, 677 (1952). — Brunner, H., G. Kuschinsky, u. G. Peters: Der Einfluß von Oxytocin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratten. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. i. Druck. (1956a). — Die maximale Geschwindigkeit der renalen Wasserausscheidung bei der Ratte und ihre Begrenzung. In Vorbereitung. (1956b). — Chanutin, A. A., H. W. Smith and L. B. Mendel: Saline diuresis in the dog. Amer. J. Physiol. **68**, 444 (1924). — Davis, J. O., D. S. Howell and R. E. Hyatt: Effect of chronic pitressin administration on electrolyte excretion in normal dogs and in dogs with experimental ascites. Endocrinology (Springfield, Ill.) **55**, 409 (1954). — Fraser, A. M.: The diuretic action of the oxytocic hormone of the pituitary gland and its effect on the assay of pituitary extracts. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **60**, 89 (1937). — The ratio between antidiuretic and pressor activity of posterior pituitary extract subjected to mild hydrolysis. J. of Physiol. **100**, 233 (1941). — The action of the oxytocic hormone of the pituitary gland on urine secretion. J. of Physiol. **101**, 236 (1942). — Finney, D. J.: Statistical Method in Biological Assay. London: Charles Griffin & Co. Ltd., 1952. — Ginsburg, M.: A method for the assay of antidiuretic activity. Brit. J. Pharmacol. **6**, 411 (1951). — Ginsburg, M., and H. Heller: The clearance of injected vasopressin from the circulation, and its fate in the body. J. of Endocrin. **9**, 283 (1953). — Gilman, A., and L. Goodman: The secretory response of the posterior pituitary to the need for water conservation. J. of Physiol. **90**, 113 (1937). — Goodman, L., and A. Gilman:

The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1st Ed. (S. 648). New York: Macmillan 1941. — Guggenheim, K.: Effect of posterior pituitary hormone on water metabolism in thiamine deficiency. Metabolism **3**, 44 (1954). — Ham, G. C.: Reproducible diuresis and chloruresis for bioassay of antidiuretic activity. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **53**, 210 (1943). — Heller, H.: The active principles of the neurohypophysis. J. of Pharmacy a. Pharmacol. **7**, 225 (1955). — Henderson, L. J., and W. W. Palmer: The determination of titratable acidity in urine. J. of Biol. Chem. **17**, 305 (1914). — Karvonen, M. J., V. Leppänen and M. E. Pittkänen: The effect of pituitrin, pitressin, and pitocin on urinary sodium and potassium excretion in the dog. Ann. Med. exp. et Biol. Fenniae **31**, 117 (1953). — Kellogg, R. H., W. R. Burack and K. J. Isselbacher: Comparison of diuresis produced by isotonic saline solutions and by water in rats studied by a steady state method. Amer. J. Physiol. **177**, 27 (1954). — Kuschinsky, G., u. H. E. Bundschuh: Über eine diuretische und Kochsalz ausschwemmende Substanz in Hypophysenhinterlappen-Präparaten. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **192**, 683 (1939). — Kuschinsky, G., u. H. Langecker: Eine mercurimetrische Bestimmung des Chlorids im Harn. Biochem. Z. **318**, 164 (1947). — Ladd, M.: The effect of prehydration on the response to saline infusion in man. J. Appl. Physiol. **3**, 379 (1950). — Leaf, A., F. C. Bartter, R. F. Santos and O. Wrong: Evidence in man that urinary electrolyte loss induced by pitressin is a function of water retention. J. Clin. Invest. **32**, 868 (1953). — Leonard, E., J. Orloff, A. Bartol and A. Preston: Regulation of ammonia excretion in the rat. Amer. J. Physiol. **182**, 131 (1955). — Lipschitz, W. L., and E. Stokey: Mechanisms of antidiuresis in the dog and in the rat. Amer. J. Physiol. **148**, 259 (1947). — Platt, R.: Structural and functional adaptation in renal failure. Brit. Med. J. **1952 I**, 1313, 1372. — Rosenbaum, J. D., W. P. Nelson III, M. B. Strauss, R. K. Davis and E. C. Rossmeisl: Variation in the diuretic response to ingested water related to the renal excretion of solutes. J. Clin. Invest. **32**, 394 (1953). — Sawyer, W. H.: Posterior pituitary extracts and excretion of electrolytes by the rat. Amer. J. Physiol. **169**, 583 (1952). — Schaumann, O.: Über den Einfluß von Oxytocin und Vasopressin auf die Ausscheidung von Kalium und Natrium durch die Niere. Experienta (Basel) **5**, 360 (1949). — Schweppe, J. S., and S. Freeman: The effect of serum protein depletion on water and salt excretion and sensitivity to pituitrin. J. Labor. a. Clin. Med. **32**, 1537 (1947). — Snedecor, G. W.: Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology. 4th Ed., The Iowa State College Press, Ames, Iowa, 1950. — Stehle, R. L.: A new method for separating pressor and oxytocic substances from the posterior lobe of the pituitary gland. J. of Biol. Chem. **102**, 573 (1933). — Der antidiuretisch wirkende Teil des Hypophysenhinterlappens. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **175**, 471 (1934). — Stehle, R. L., and A. M. Fraser: The purification of the pressor and oxytocic hormones of the pituitary gland, and some observations on the chemistry of the products. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **55**, 136 (1935). — Stein, M., R. Jinks and I. A. Mirsky: The bioassay of pitressin and antidiuretic substances in blood and urine. Endocrinology (Springfield, Ill.) **51**, 492 (1953). — Steinitz, K.: Methoden des klinisch-chemischen Laboratoriums (Türkisch). Istanbul 1942. — Verney, E. B.: The secretion of pituitrin in mammals, as shown by perfusion of the isolated kidney of the dog. Proc. Roy. Soc. Ser. B. **99**, 487 (1926). — Polyuria. 1. Polyuria associated with pituitary dysfunction. Lancet **216 I**, 539 (1929). — Absorption and excretion of water: Antidiuretic hormone. Lancet **251 II**, 739, 781 (1946). — The antidiuretic hormone, and the factors which determine its release. Proc. Roy. Soc. Ser. B. **135**, 25 (1947). — Agents determining and influencing the functions of the pars nervorsa of the pituitary. Brit. Med. J. **1948 II**, 119.

Professor Dr. G. Kuschinsky, Mainz, Pharmakol. Institut d. Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 457—473 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Der Einfluß von Oxytocin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte

Von
H. Brunner, G. Kuschinsky und G. Peters

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Januar 1956)

Eine Reihe von Untersuchungen an verschiedenen Tierarten haben in den letzten Jahren gezeigt, daß vom Hypophysenhinterlappen unter allen untersuchten Umständen mehr Oxytocin als Vasopressin in die Blutbahn abgegeben wird (B. A. Gross 1951; G. Peeters 1950; G. W. Harris 1947, 1948; V. C. Abrahams und M. Pickford 1954). Die Angaben über das Verhältnis der abgegebenen Oxytocin- zu den Vasopressinmengen schwanken dabei unter verschiedenen Bedingungen, zwischen 100 : 1 und 4 : 1. Oxytocin überwiegt im HHL.-Inkret nicht nur dann, wenn zur Beantwortung des Ausschüttungsreizes (z. B. Säugen) Oxytocin erforderlich erscheint, sondern auch unter den Bedingungen, unter denen eher eine bevorzugte „Adiuretin"-, d. h. Vasopressin-Sekretion erwartet werden müßte (V. C. Abrahams, M. Pickford 1954); eine bevorzugte Ausschüttung von Vasopressin ist unseres Wissens bisher nie beobachtet worden. — Unter diesen Umständen gewinnt die zuerst von A. M. Fraser (1937) und unabhängig davon von G. Kuschinsky und H. E. Bundschuh (1939) beschriebene und in Nachuntersuchungen bestätigte diuretische (A. M. Fraser 1942; O. Schaumann 1949) und salzausscheidungsfördernde (G. Kuschinsky, H. E. Bundschuh 1939; A. M. Fraser 1942; O. Schaumann, L. Schmidt 1948; O. Schaumann 1949; S. E. Dicker, H. Heller 1946) Wirkung von Oxytocin bei der Ratte ein neues Interesse. — Zweck der vorliegenden Untersuchungen war, die diuretische und saluretische Wirkung von Oxytocin näher zu charakterisieren und ihre gegenseitige Beeinflussung mit den unter vergleichbaren Bedingungen genauer untersuchten Wirkungen von Vasopressin (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956) zu ermitteln.

Methodik

Mit 10 + 8 ml H_2O oder 7 + 5 ml 0,9% NaCl-Lösung gewässerten Ratten wurde 50 min nach der Wässerung s. c. Oxytocin injiziert: Als Ausdruck der Wirkung auf die Diurese wurde die Harnmenge von der 20.—50. Minute nach der Injektion in ml/Std/Ratte angesehen. Außerdem wurde der Harn vom Zeitpunkt der Injektion

ab bis zur 90. Minute danach zur Bestimmung von Na^+, K^+ und Cl' gesammelt. Behandlung der Tiere, Harnsammlung, Auswertung der Versuche, statistische Überprüfung und chemische Bestimmungen wurden in der früher beschriebenen Weise (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956) durchgeführt. Das gleiche gilt für alle Einzelheiten der Versuche an durstenden Ratten. Unter „Dursten" ist in der vorliegenden Arbeit Wasser- und gleichzeitige Nahrungskarenz zu verstehen.

Als Oxytocin-Präparat wurden Orasthin-Ampullen der Farbwerke Hoechst* in geeigneten Verdünnungen in 0,9% NaCl-Lösung verwandt. Das Handelspräparat enthält 1,5—2,4 E antidiuretische Wirkung pro 100 E Oxytocin. Alle Versuchstiere wurden durch 1—2 maligen mehrstündigen Aufenthalt in den Diuresekäfigen unter den Versuchsbedingungen, 2malige Gabe von je 10 ml/Ratte Wasser durch die Magensonde und 2malige s.c. Injektion von je 1 ml 0,9% NaCl im Abstand von 3 Tagen eingewöhnt. Das s.c. Injektionsvolumen betrug immer 0,5 ml. Bei Versuchen mit Vasopressin und Oxytocin wurden beide Hormone unmittelbar hintereinander in je 0,25 ml 0,9% NaCl-Lösung an verschiedenen Stellen s. c. injiziert.

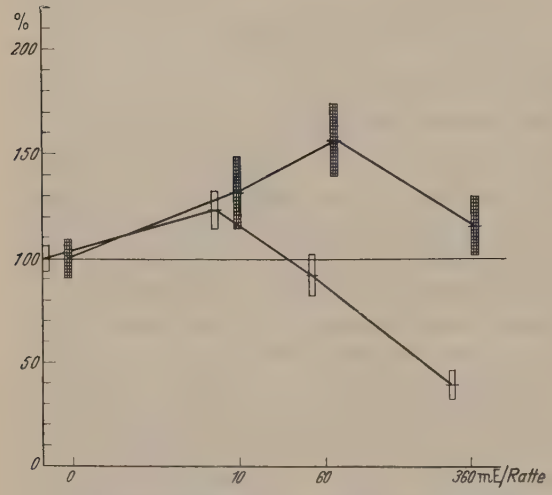


Abb. 1. Diurese „gewässerter" Ratten zwischen der 20. und 50. min nach der s.c. Injektion von Oxytocin, ausgedrückt in % des Mittelwertes der Kontrollgruppe. Kolumnen: Mittelwert (Querbalken) ± Standardabweichung des Mittelwerts ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). Weiße Felder: Wässerung mit 18 ml Wasser/Ratte, Gekreuzt schraffierte Felder: Wässerung mit 12 ml 0,9% NaCl. — Gruppen von je 8 Tieren (4 ♂ und 4 ♀): Zwischen den Geschlechtern bestanden keine signifikanten oder angedeuteten Unterschiede

Ergebnisse

1. Diurese

Abb. 1 zeigt den Einfluß von Oxytocin auf die Wasserdiurese und die Diurese nach oraler Gabe von 0,9% NaCl-Lösung. Eine signifikante Beschleunigung der Wasserdiurese ließ sich nicht nachweisen; die Antidiurese nach 360 mE/Ratte Oxytocin könnte durch den Vasopressingehalt von Orasthin erklärt werden. Nach Gabe von 0,9% NaCl-Lösung bewirken 10—60 mE Oxytocin/Ratte eine Diuresesteigerung um maximal ungefähr 50%, die bei weitem nicht das Ausmaß der diuretischen Oxytocinwirkungen bei durstenden Ratten (s. u.) erreicht: Steigerung der Oxytocin-Dosis führt anscheinend zu einem Verlust dieser Wirkung, der nicht auf den Vasopressin-Gehalt des Präparates zurückgeführt werden kann, weil Vasopressin unter diesen Bedingungen nicht antidiuretisch wirkt.

* Wir danken den Farbwerken Hoechst für die Überlassung größerer Versuchsmengen Orasthin-Ampullen.

Die Harnabsonderung durstender Ratten fällt vom Zeitpunkt des Entzuges des bis dahin ad lib. zur Verfügung stehenden Wassers und der phys. NaCl-Lösung an bis zur 5. Stunde des Durstens kontinuierlich ab: Zwischen der 6. und 9. Stunde wird die „Grunddiurese" (G. KUSCHINSKY, H. LANGECKER 1947) erreicht, die dann bis zur 27. Stunde des Durstens nicht weiter absinkt (Tab. 1). Der in Tab. 1 für die Harnabsonderung der ersten 3 Std angegebene Wert liegt etwas zu hoch: Er stammt von Ratten, die zu Beginn des Durstens s. c. 0,5 ml 0,9% NaCl erhalten hatten: Diese

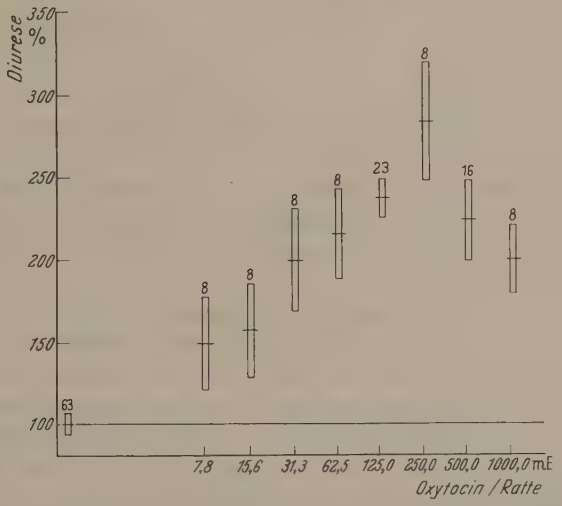


Abb. 2. Einfluß von Oxytocin auf die Diurese durstender Ratten in den ersten 3 Std des Wasserentzugs. Abszisse: Orasthin-Dosis in mE/Ratte s.c.-Ordinate: Harnausscheidung in den auf die Injektion folgenden 3 Std in % des Mittelwerts der nur mit 0,5 ml 0,9% NaCl s. c. behandelten Kontrollgruppe des Versuchstages (Transformation erforderlich, da die Streuung zwischen verschiedenen Versuchstagen größer ist als die Streuung zwischen den Tieren an einem Versuchstag). Angegeben sind Mittelwerte ($\bar{x}$: Querbalken) $\pm s_{\bar{x}}$. Die absolute Größe der Harnausscheidung der Kontrolltiere ergibt sich aus Tab. 1. Zahl der Versuche über den Kolumnen

zusätzliche Wassermenge wird innerhalb von 3 Std ausgeschieden. Die Wasserausscheidung während der ersten 3 Std des Durstens betrug bei den in der Tabelle angeführten Tieren $1{,}69 \pm 0{,}11$ ml/Ratte/3 Std ($n = 63$), bei einer Gruppe von ganz unbehandelten Ratten dagegen $0{,}94 \pm 0{,}14$ ml/Ratte/3 Std ($n = 32$).

Oxytocin steigert nun in einem sehr weiten Dosenbereich von 15 bis 1000 mE/Ratte (ungefähr 0,075—5,0 E/kg) die Diurese der durstenden Ratten in den 3 auf die Injektion folgenden Stunden ganz erheblich: Schon 30 mE/Ratte bewirken eine wesentliche Steigerung. Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve ist aus Abb. 2 zu ersehen.

Im Gegensatz zu den rasch abklingenden antidiuretischen und diuretischen Wirkungen von s.c.-injiziertem Vasopressin beginnt die diuretische Oxytocinwirkung erst in der 2. Stunde nach der Injektion,

Tabelle 1.

Harnausscheidung „unbehandelter" durstender Kontrollratten zu verschiedenen Zeiten nach Entzug von Trink-Wasser und -NaCl-Lösung in ml/Ratte/Std. ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Dauer des Durstens Std	0	3	6	9	24
Versuchszahl	63	71	79	35	16
Diurese ml/Ratte/Std	0,56 ± 0,04	0,25 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,21 ± 0,03

hält dann etwa 3 Std an und ist von der 5. Stunde ab nicht mehr nachzuweisen (Tab. 2).

Wenn Oxytocin zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Durstens injiziert wird, nimmt die diuretische Wirkung mit absinkender Diurese der unbehandelten Kontrolltiere bis zum Erreichen der Grunddiurese und etwas darüber hinaus (6. bis 9. Stunde) zunächst zu, um schließlich bei noch längerem Dursten wieder geringer zu werden: auch nach 24stündigem Dursten steigern aber 125 mE/Ratte die Diurese noch auf das Doppelte (Tab. 3).

Bemerkenswert erscheint nun, daß die starke diuretische Oxytocin-Wirkung bei durstenden Ratten durch gleichzeitige Gabe von Vasopressin im Verhältnis Vasopressin : Oxytocin 1 : 4 bis 1 : 2 nicht beeinflußt und vielleicht sogar gesteigert und erst durch Vasopressin 1 : 1 — d. h. in einem wahrscheinlich unphysiologischen Verhältnis — abgeschwächt und vielleicht sogar aufgehoben wird (Tab. 4). Der Einfluß von Vasopressin allein auf die Diurese durstender Ratten wurde an anderer Stelle dargestellt (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956a). Die in Orasthin enthaltenen Vasopressin-Mengen haben unter diesen Umständen *keine* diuretische Wirkung.

Umgekehrt wird aber die Hemmwirkung von Vasopressin auf die Wasserdiurese schon durch gleichzeitige Gabe der doppelten Oxytocindosis und in noch stärkerem Maß durch die 4—8fache Oxytocindosis wesentlich abgeschwächt. Bei Zusatz der vierfachen Oxytocindosis wären im Beispiel der Tab. 5 bei einer biologischen Standardisierung nach antidiuretischer Wirkung statt der tatsächlich injizierten 10 mE Vasopressin nur etwa 1—4 mE gefunden worden — und auch die gleichzeitige Anwesenheit der doppelten Oxytocindosis hätte das Ergebnis nicht wesentlich weniger beeinträchtigt.

2. Ausscheidung von Natrium und Chlorid

Im Gegensatz zu Vasopressin bewirkt Oxytocin bei mit Wasser oder 0,9% NaCl-Lösung gewässerten Ratten keine oder höchstens eine recht geringfügige Steigerung der Konzentration von Na^+ oder Cl' im Harn. (Die nach sehr hohen Orasthindosen beobachteten Steigerungen sind

zweifellos auf deren Vasopressingehalt zurückzuführen.) Dagegen steigert Oxytocin die *Ausscheidung* von Na^+ und Cl' regelmäßig im gleichen Maß wie die Ausscheidung von Wasser, so daß die Salzausscheidung bei der durch Oxytocin nicht beeinflußbaren Wasserdiurese nicht, bei Gabe von 0,9% NaCl im gleichen Sinn und im gleichen Ausmaß wie die Wasserausscheidung gesteigert wird.

Bei *unbehandelten* durstenden Ratten sinkt auch die Na^+- und Cl'-Ausscheidung ebenso wie die Wasserausscheidung innerhalb von 6 Std. Durst auf einen Grundausscheidungswert ab, der sich bei weiterem Dursten nicht mehr signifikant verändert (Tab. 7).

In gleicher Weise wie bei gewässerten Ratten steigert Oxytocin auch bei durstenden Ratten regelmäßig und beträchtlich die Salz*ausscheidung*: Die Wirkung geht der Beeinflussung der Wasserausscheidung parallel. Während die Cl'-Konzentrationen im Harn über die bei durstenden Ratten erforderlichen längeren Harnsammelperioden durch Oxytocin überhaupt nicht gesteigert wird, zeigt die Na^+-Konzentration einen im Ausmaß weit hinter der *Ausscheidungs*zunahme zurückbleibenden Anstieg nach höheren Orasthin-Dosen. Auch hier ist es möglich, daß der Konzentrationsanstieg durch den Vasopressingehalt des Präparates bedingt ist (Tab. 8).

Während bei den kleineren Oxytocin-Dosen die Wirkungen auf Na^+- und Cl'-Ausscheidung einander die Waage halten, wird unter der Einwirkung von Oxytocin-Dosen von 125 mE/Ratte und darüber die Na^+-Ausscheidung prozentual stärker als die Cl'-Ausscheidung gesteigert. — Die Dauer des der Oxytocin-Injektion (und dem Beginn der Harnsammlung) vorangegangenen Durstes beeinflußt die Salzausscheidungssteigerung durch Oxytocin bis zu einer Durstdauer von 6 Std nicht; nach 9—24stündigem Durst erfährt die Oxytocinwirkung eine leichte Abschwächung: 125 mE Oxytocin steigern jetzt die Na^+- und Cl'-Ausscheidung nur mehr auf ungefähr das Doppelte der Ausscheidung der Kontrollen. Der Unterschied der Ausscheidungen von Kontrollen und Oxytocintieren ist aber auch nach 24stündigem Dursten

Tabelle 2. *Harnausscheidung von Gruppen von je 8 Ratten (ml/Ratte/Std) nach s.c.-Injektion von 500 mE Oxytocin/Ratte. Jeweils* $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Wahrscheinlichkeit der Zufälligkeit der Unterschiede („Signifikanz"): $^+ = P < 0{,}05$; $^{++} = P < 0{,}01$; $^{+++} = P < 0{,}001$

Stunden nach Injektion	1.	2.	3.	4.	5.	6.—9.
Kontrollen	0,75 ± 0,26	0,26 ± 0,09	0,49 ± 0,18	0,18 ± 0,08	0,28 ± 0,14	0,10 ± 0,02
500 mE Oxytocin	0,24 ± 0,11	$1{,}24^+ \pm 0{,}37$	$1{,}93^{++} \pm 0{,}28$	$1{,}35^+ \pm 0{,}46$	0,23 ± 0,11	0,08 ± 0,04

Tabelle 3. *Harnausscheidung von Ratten, denen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Durstens 125 mE Orasthin/Ratte injiziert wurden, innerhalb der 3 auf die Injektion folgenden Stunden.*

Werte in ml/Ratte/Std und in % des Mittelwertes der Kontrolltiere (gleichzeitige s.c. Injektion von 0,5 ml 0,9% NaCl). Signifikanzen der Unterschiede zwischen Kontroll- und behandelten Tieren wie in Tab. 2. $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. (In Klammern Versuchszahlen)

Dauer des Durstens Std		0	3	6	9	24
Kontrollen	ml/Ratte/Std	0,56 ± 0,04 (63)	0,24 ± 0,08 (8)	0,18 ± 0,05 (8)	0,13 ± 0,05 (8)	0,23 ± 0,05 (8)
	%	100,0 ± 7,1 (63)	100,0 ± 33,3 (8)	100,0 ± 27,8 (8)	100,0 ± 38,5 (8)	100,0 ± 21,7 (8)
125 mE Oxytocin/ Ratte s.c.	ml/Ratte/Std	$1{,}30^{+++}$ ± 0,23 (23)	$0{,}95^{+++}$ ± 0,12 (8)	$0{,}74^{++}$ ± 0,16 (8)	$0{,}33^{+}$ ± 0,07 (8)	$0{,}41^{++}$ ± 0,03 (8)
	%	$239{,}1^{+++}$ ± 12,1 (23)	$401{,}4^{+++}$ ± 50,5 (8)	$405{,}5^{++}$ ± 85,5 (8)	$261{,}3^{+}$ ± 58,7 (8)	$182{,}2^{++}$ ± 13,3 (8)

Tabelle 4. *Wasserausscheidung durstender Ratten (in den ersten 3 Std des Wasserentzuges) nach s.c. Injektion einer diuretischen Oxytocin-Dosis allein und bei gleichzeitiger Injektion von $^1/_4$, $^1/_2$ und $^1/_1$ Dosis von Vasopressin an einer anderen Stelle.*

Werte in % des Mittelwertes der unbehandelten Kontrollen des jeweiligen Versuchstages. $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Versuchszahlen in Klammern. Signifikanz der Unterschiede gegenüber unbehandelten Kontrollen wie in Tab. 2

Oxytocin mE/Ratte s. c.	—	125	125	125	125
Vasopressin mE/Ratte	—	—	31.25	62,5	125
Harnausscheidung % . . .	100 ± 6,5 (63)	$255{,}6^{+++}$ ± 32,8 (15)	$356{,}4^{+++}$ ± 41,8 (6)	$384{,}0^{+}$ ± 93,3 (8)	183,4 ± 58,7 (6)
Beeinflussung der Oxytocinwirkung	—	—	Steigerung: $P < 0{,}05$	Nicht signifikant	Nicht signifikant

Tabelle 5. *Abschwächung der antidiuretischen Wirkung von Vasopressin auf die Wasserdiurese durch gleichzeitige Injektion von Oxytocin. Wasserausscheidungen bei oral eingeleiteter Wasserdiurese zwischen der 20. und 50. min nach s.c. Injektion von 10 mE Vasopressin/Ratte und verschiedenen Dosen von Oxytocin an einer anderen Stelle.*

Werte in ml/Ratte/Std: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Signifikanz der Unterschiede zwischen nur mit Vasopressin und mit Vasopressin + Oxytocin behandelten Tieren: $^{+} = P < 0{,}05$; $^{++} = P < 0{,}01$; $^{+++} = P < 0{,}001$

Vasopressin mE/Ratte s.c.	—	10	10	10	10
Oxytocin mE/Ratte s.c.	—	—	20	40	80
Harnausscheidung ml/Std/Ratte	5,88 ± 1,20 (8)	0,73 ± 0,25 (8)	$1{,}95^{+}$ ± 0,36 (8)	$2{,}83^{++}$ ± 0,58 (7)	$1{,}85^{+}$ ± 0,39 (8)

Tabelle 6. *Wirkung von Oxytocin auf die Na^{+}- und Cl'-Ausscheidung gewässerter Ratten innerhalb der 90 auf die Injektion folgenden Minuten.*

Konzentrationen in mÄqu%, Ausscheidungen (Kursivzahlen) in mÄqu/Ratte/90 min. Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Signifikanz der Unterschiede gegenüber unbehandelten Kontrollen wie in Tab. 2. Versuchszahlen in Klammern

Oxytocin mE/Ratte s.c.			—	10	60	360
Wässerung mit 18 ml H_2O	Na^{+}	mÄq% . .	0,79 ± 0,13 (13)	$3{,}15^{+}$ ± 1,01 (6)	2,91 ± 1,08 (6)	$10{,}43^{+++}$ ± 1,44 (6)
		mÄq/Ratte .	*0,075 ± 0,013 (13)*	*$0{,}408^{+}$ ± 0,131 (6)*	*0,311 ± 0,120 (6)*	*$0{,}506^{++}$ ± 0,112 (6)*
	Cl'	mÄq% . .	1,34 ± 0,25 (13)	1,27 ± 0,41 (6)	1,72 ± 0,41 (6)	$8{,}18^{+++}$ ± 1,11 (6)
		mÄq/Ratte .	*0,196 ± 0,066 (13)*	*0,165 ± 0,055 (6)*	*0,177 ± 0,046 (6)*	*$0{,}390^{++}$ ± 0,075 (6)*
12 ml 0,9% NaCl	Na^{+}	mÄq% . .	13,89 ± 1,19 (11)	14,91 ± 0,41 (7)	15,48 ± 0,61 (6)	$26{,}71^{+}$ ± 5,53 (6)
		mÄq/Ratte .	*0,589 ± 0,086 (11)*	*$0{,}978^{+}$ ± 0,082 (7)*	*$0{,}988^{++}$ ± 0,081 (6)*	*$1{,}384^{+}$ ± 0,272 (6)*
	Cl'	mÄq% . .	15,49 ± 0,67 (11)	16,85 ± 0,58 (7)	16,79 ± 1,49 (6)	$23{,}43^{+}$ ± 1,84 (6)
		mÄq/Ratte .	*0,738 ± 0,078 (11)*	*$1{,}100^{++}$ ± 0,090 (7)*	*1,067 ± 0,127 (6)*	*$1{,}304^{+++}$ ± 0,062 (6)*

Tabelle 7. *Na^+- und Cl'-Ausscheidung durstender Ratten nach verschieden langem Dursten.*
Harnsammelperioden von 3 Std. — Konzentrationen im Harn in mÄqu%; Ausscheidungen in mÄqu/Ratte/Std, Mittelwerte $x \pm s_{\bar{x}}$. In Klammern Tierzahlen

Dauer des Durstens Std		—	3	6	24
Na^+	Konzentration in mÄq%	7,59 ± 0,74 (39)	8,44 ± 0,89 (16)	7,32 ± 0,92 (8)	7,69 ± 1,12 (16)
	Ausscheidung in mÄq/Ratte/Std .	*0,031 ± 0,005 (39)*	*0,026 ± 0,004 (16)*	*0,015 ± 0,005 (8)*	*0,016 ± 0,003 (16)*
Cl'	Konzentration in mÄq%	16,81 ± 1,24 (39)	15,16 ± 1,80 (16)	17,88 ± 2,36 (8)	10,52 ± 1,51 (16)
	Ausscheidung in mÄq/Ratte/Std .	*0,050 ± 0,006 (39)*	*0,044 ± 0,007 (16)*	*0,030 ± 0,007 (8)*	*0,022 ± 0,004 (16)*

Tabelle 8. *Wirkung von Oxytocin auf die Ausscheidung von Na^+ und Cl' im Harn.*
Trinkflüssigkeitsentzug gleichzeitig mit s.c.-Oxytocininjektion; Harnsammelperioden von 9 Std. Konzentrationen im Harn in mÄq%, Ausscheidungen in mÄq/Ratte/Std; jeweils $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, in Klammern Versuchszahlen. Signifikanz der Unterschiede gegenüber unbehandelten Kontrollen wie in Tab. 2

Oxytocin mE/Ratte s.c.		—	7,82	15,63	31,25	62,5
Na^+	mÄq%	10,55 ± 0,53 (56)	10,29 ± 0,72 (8)	11,35 ± 1,10 (8)	10,92 ± 0,77 (8)	$14{,}30^{+}$ ± 0,95 (8)
	mÄq/Ratte/Std	*0,037 ± 0,003 (56)*	*0,037 ± 0,006 (8)*	*0,037 ± 0,005 (8)*	*$0{,}064^{++}$ ± 0,009 (8)*	*$0{,}061^{++}$ ± 0,009 (8)*
Cl'	mÄq%	16,30 ± 0,78 (56)	15,86 ± 0,77 (8)	17,11 ± 2,33 (8)	15,38 ± 1,29 (8)	16,31 ± 0,52 (8)
	mÄq/Ratte/Std	*0,054 ± 0,004 (56)*	*0,058 ± 0,010 (8)*	*0,054 ± 0,005 (8)*	*$0{,}086^{+}$ ± 0,010 (7)*	*0,069 ± 0,008 (8)*

Oxytocin mE/Ratte s. c.		125,0	250,0	500,0	1000,0
Na^+	mÄq%	$12{,}66^{+}$ ± 0,50 (16)	$15{,}89^{+++}$ ± 1,19 (8)	$13{,}29^{++}$ ± 0,50 (16)	$16{,}36^{+++}$ ± 0,90 (8)
	mÄq/Ratte/Std	*$0{,}071^{+++}$ ± 0,006 (16)*	*$0{,}100^{+++}$ ± 0,015 (8)*	*$0{,}092^{+++}$ ± 0,010 (16)*	*$0{,}113^{+++}$ ± 0,008 (8)*
Cl'	mÄq%	14,88 ± 0,79 (16)	15,93 ± 0,74 (8)	14,00 ± 0,66 (16)	18,27 ± 2,04 (8)
	mÄq/Ratte/Std	*$0{,}083^{++}$ ± 0,007 (16)*	*$0{,}097^{++}$ ± 0,013 (8)*	*$0{,}095^{++}$ ± 0,010 (16)*	*$0{,}129^{+++}$ ± 0,020 (8)*

noch immer hoch signifikant ($P < 0{,}001$: Achter-Gruppen). Auf die Wiedergabe der einzelnen Werte soll verzichtet werden.

Die saluretische Wirkung von Oxytocin bei dursten-den Ratten wird durch die gleichzeitige Injektion von Vasopressin im Verhältnis 1 Vasopressin : 4 Oxytocin eindeutiger als die diuretische Wirkung (Tab. 4) gesteigert: Die gleichzeitige Injektion von Vasopressin im Verhältnis 1 : 1 hat trotz der dadurch bedingten Abschwächung der diuretischen Wirkung keine Abschwächung der natriuretischen und chloruretischen Oxytocinwirkung zur Folge, weil jetzt die für Vasopressin charakteristische Wirkung der Steigerung der *Konzentration* von Na^+ und Cl' im Harn (anscheinend stärker und länger anhaltend als bei Gabe von Vasopressin allein) in Erscheinung tritt (Tab. 9).

Auch an Tieren im Zustand der Wasserdiurese läßt sich die synergistische Beeinflussung der Na^+- und Cl'-Ausscheidung durch Vasopressin und Oxytocin zeigen. 10 mE/Ratte Vasopressin wirken stark antidiuretisch und verändern die Na^+- und Cl'-Ausscheidung nicht, so daß die Konzentrationen im Harn wesentlich ansteigen. Da nun Oxytocin die

Tabelle 9. *Einfluß von gleichzeitig (an anderer Stelle) s.c. injiziertem Vasopressin auf die natriuretische und chloruretische Oxytocin-Wirkung an durstenden Ratten.*

Injektionen bei Durstbeginn; Harnsammelperiode 3 Std. — Konzentrationen in mÄq%; Ausscheidungen in mÄq/Ratte/Std. — Mittelwerte $\bar{x} \pm s\bar{x}$. Signifikanz der Unterschiede gegenüber unbehandelten Kontrollen: $^+ = P < 0{,}05$; $^{++} = P < 0{,}01$; $^{+++} = P < 0{,}001$. †: Signifikanz der Unterschiede gegenüber den nur mit Oxytocin behandelten Gruppen. In Klammern Zahl der Versuche

	Oxytocin mE/Ratte s.c.	—	125	125	125
	Vasopressin mE/Ratte s.c.	—	—	31,25	125
Na^+	mÄq%	9,43 ± 2,08 (7)	12,94 ± 1,06 (7)	13,81 ± 0,97 (6)	$18{,}85^{++}$ ± 1,93 (6)
	†			—	Steigerung $P < 0{,}05$
	mÄq/Ratte/Std	*0,033 ± 0,009 (7)*	*$0{,}105^{++}$ ± 0,011 (7)*	*$0{,}157^{+++}$ ± 0,018 (6)*	*$0{,}109^{+}$ ± 0,036 (6)*
	†			Steigerung $P < 0{,}05$	—
Cl'	mÄq%	16,01 ± 2,99 (7)	15,27 ± 0,53 (7)	14,07 ± 0,48 (6)	$26{,}83^{+}$ ± 3,70 (6)
	†			—	Steigerung $P < 0{,}01$
	mÄq/Ratte/Std	*0,050 ± 0,010 (7)*	*$0{,}120^{++}$ ± 0,015 (7)*	*$0{,}157^{++}$ ± 0,022 (6)*	*$0{,}126^{+}$ ± 0,037 (6)*
	†			—	—

Tabelle 10. *Synergistische Wirkung von Vasopressin und Oxytocin auf Na^+- und Cl'-Ausscheidung bei Wasserdiurese.*
Versuchsgruppe der Tab. 5. Konzentrationen mÄq%, Ausscheidungen in mÄq/Ratte/90 min. Bezeichnungen und Zeichen wie in Tab. 9

Vasopressin mE/Ratte s.c.	—	10	10	10	10
Oxytocin mE/Ratte s.c.	—	—	20	40	80
Na^+ mÄq%	3,23 ± 1,23 (8)	5,42 ± 0,94 (8)	8,85+ ± 1,50 (8)	7,60+ ± 0,86 (8)	8,84++ ± 0,46 (8)
†			—	—	Steigerung $P < 0,05$
Na^+ mÄq/Ratte/90 min	*0,214 ± 0,067 (8)*	*0,234 ± 0,067 (8)*	*0,289 ± 0,036 (8)*	*0,322+ ± 0,037 (8)*	*0,387 ± 0,061 (8)*
†			—	—	—
Cl' mÄq%	3,56 ± 1,34 (8)	6,04 ± 1,51 (8)	10,44++ ± 1,61 (8)	6,48 ± 0,88 (8)	10,62++ ± 1,12 (8)
†			—	—	—
Cl' mÄq/Ratte/90 min	*0,236 ± 0,069 (8)*	*0,159 ± 0,034 (8)*	*0,349 ± 0,034 (8)*	*0,289 ± 0,066 (8)*	*0,370 ± 0,054 (8)*
†			Steigerung $P < 0,01$	—	Steigerung $P < 0,01$

Na^+- und Cl'-Konzentrationen im Harn zumindest nicht senkt (und vielleicht sogar weiter steigert) und gleichzeitig die Vasopressin-Antidiurese wesentlich abschwächt, kommt es zu einer Steigerung der Salzverluste mit dem Harn (Tab. 10).

3. Ausscheidung von Kalium

Während sowohl bei unbehandelten Ratten als auch unter der Einwirkung von Vasopressin (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956a) die K^+-Konzentration im Harn und damit die K^+-Ausscheidung in direkter Abhängigkeit von der Na^+-Konzentration steigt oder fällt, geht die Oxytocin-Natriurese, -Chlorurese und -Diurese *nicht* mit einer entsprechenden Steigerung der K^+-Ausscheidung einher. So wurde bei den mit 12 ml 0,9% NaCl per os gewässerten Ratten (Tab. 6 und Abb. 1) die K^+-Ausscheidung von 0,107 ± 0,012 mÄq/Ratte/90 min (8) durch 10—360 mE/Ratte Oxytocin s. c. nicht verändert. Bei durstenden Ratten, die zu Durstbeginn 7,82—1000,0 mE Oxytocin/Ratte s. c. erhalten hatten, und bei denen der Sammelharn von 9 Std nach der Injektion analysiert wurde (Tab. 8), ergab sich unter der Einwirkung von 7,82—1000,0 mE Oxytocin/Ratte s. c. gleichfalls keine Veränderung der K^+-Ausscheidung: Sie betrug bei den Kontrollen 0,021 ± 0,002 mÄq pro Ratte/Std (56 Versuche). Da Oxytocin unter diesen Umständen stark diuretisch wirkt (Abb. 2) und die K^+-Ausscheidung nicht verändert wird, sinkt unter Oxytocin die K^+-Konzentration

Tabelle 11. *Wirkung von Oxytocin auf die K^+-Ausscheidung.*

Injektion zu verschiedenen Zeiten nach Beginn des Durstens. Harnsammelperioden 3 Std nach der Injektion. Konzentrationen in mÄq%; Ausscheidungen in mÄq/Ratte/Std. Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. Versuchszahlen in Klammern. Signifikanz der Unterschiede zwischen Oxytocin und unbehandelten Tieren wie in Tab. 2 usw.

Dauer des Durstens Std		—	3	6	9	24
Kontrollen	Konzentration in mÄq%	5,41 ± 0,65 (39)	5,79 ± 0,90 (16)	6,74 ± 1,81 (8)		6,51 ± 0,98 (16)
	mÄq/Ratte/Std	*0,018 ± 0,003(39)*	*0,019 ± 0,003(16)*	*0,014 ± 0,003(8)*	*0,011 ± 0,003 (8)*	*0,014 ± 0,003(16)*
125 mE Oxytocin/Ratte s.c.	Konzentration in mÄq%	6,05 ± 1,08 (7)	5,68 ± 0,72 (8)	5,15 ± 0,84 (8)		6,41 ± 0,90 (8)
	mÄq/Ratte/Std	*$0{,}060^{+++} \pm 0{,}007$ (7)*	*$0{,}050^{+++} \pm 0{,}005$ (8)*	*0,042 ± 0,013 (8)*	*0,016 ± 0,005 (8)*	*0,023 ± 0,005 (8)*

Tabelle 12. *Einfluß von Oxytocin auf die Ausscheidung von ($NH_4^+ + H^+$).*

Injektion bei Durstbeginn. Harnsammelperioden 9 Std. Zeichen und Bezeichnungen wie in Tab. 8

Oxytocin mE/Ratte s.c.		—	7,82	15,63	31,25	62,5
$NH_4^+ + H^+$	mÄq% . . .	10,55 ± 0,86 (56)	9,50 ± 0,66 (8)	9,21 ± 1,70 (8)	$4{,}92^{++} \pm 0{,}72$ (8)	$3{,}50^{+++} \pm 0{,}86$ (8)
	mÄq/Ratte/Std	*0,033 ± 0,003 (56)*	*0,037 ± 0,008 (8)*	*0,027 ± 0,003 (8)*	*$0{,}024^{+} \pm 0{,}003$ (8)*	*$0{,}015^{++} \pm 0{,}004$ (8)*

Oxytocin mE/Ratte s.c.		125,0	250,0	500,0	1000,0
$NH_4^+ + H^+$	mÄq% . . .	$3{,}73^{+++} \pm 0{,}53$ (16)	$2{,}33^{+++} \pm 0{,}42$ (8)	$4{,}14^{++} \pm 0{,}69$ (16)	$2{,}94^{++} \pm 0{,}77$ (8)
	mÄq/Ratte/Std	*$0{,}020^{++} \pm 0{,}003$ (16)*	*$0{,}014^{+++} \pm 0{,}003$ (8)*	*0,025 ± 0,004 (16)*	*$0{,}018^{+} \pm 0{,}005$ (8)*

im Harn von 6,52 ± 0,48 mÄq% (56) bei den Kontrollen auf 3,95 ± 0,41 mÄq% (16), unter 125 mE/Ratte und auf 3,50 ± 0,20 mÄq% (8) unter 1000 mE Oxytocin/Ratte. — Es muß aber mit der Möglichkeit gerechnet weden, daß bei der Untersuchung des 9 Std-Sammelharns eine im Gegensatz zur natriuretischen und chloruretischen Wirkung nur kurz anhaltende Steigerung der K^+-Ausscheidung durch höhere Oxytocindosen verschleiert wird: Wenn der Harn nur 3 Std nach der Injektion gesammelt wird, ergibt sich jedenfalls eine Steigerung der K^+-Ausscheidung durch 125 mE/Ratte Oxytocin. Diese Steigerung läßt sich aber — gleichfalls im Gegensatz zur Oxytocinwirkung auf Na^+- und Cl'-Ausscheidung bei länger als 3 Std durstenden Tieren nicht mehr nachweisen (Tab. 11).

Tab. 11 unterrichtet gleichfalls über das Absinken der K^+-Ausscheidung auf den Grundausscheidungswert von 0,014 ± 0,003 mÄq pro Ratte/Std innerhalb von 6 Std im Durst.

Die kurze Steigerung der K^+-Ausscheidung unter 125 mE/Ratte Oxytocin s. c. wird durch die gleichzeitige Gabe von 31,25—125 mE/Ratte Vasopressin weder verstärkt noch abgeschwächt.

4. Ausscheidung von H^+-Ionen

Als Maß der Ausscheidung von H^+-Ionen durch die Nieren-Tubuli haben wir die Summe der Titrationsacidität und der NH_4^+-Ausscheidung angesehen, weil unter unseren Versuchsbedingungen der limitierende Faktor für die NH_4^+-Ausscheidung im Harn (freies NH_3 trat im Harn der durstenden Ratten nur in mit der angewandten Methode nicht erfaßbaren Spuren auf) zweifelsohne die Freisetzung der H^+-Ionen ist. Wir haben dieses Vorgehen bereits an anderer Stelle begründet (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956). — Von einer Untersuchung der Beeinflussung der geringen H^+-Ausscheidung gewässerter Ratten haben wir abgesehen.

Bei durstenden (und gleichzeitig hungernden) Ratten sinkt die Ausscheidung von ($H^+ + NH_4^+$) im Harn von 0,028 ± 0,004 mÄq/Ratte/Std (Harnsammlung in 3 Std-Perioden) nach 6stündigem Durst auf 0,016 ± 0,004 mÄq/Ratte/Std (8); nach 24stündigem Durst betrug die Ausscheidung 0,023 ± 0,005 (8) mÄq/Ratte/Std: Es läßt sich nicht entscheiden, ob dieser Wert einem Wiederansteigen der H^+-Sekretion entspricht.

Oxytocin in Dosen von 15—1000 mE/Ratte s. c. bewirkt innerhalb der *9* auf die Injektion folgenden Stunden eine in gleicher Weise wie die Steigerung der Wasserausscheidung dosisabhängige Senkung der Säureausscheidung (Tab. 12).

Es ist möglich, aber nicht sicher, daß der Senkung der H^+-Sekretion unter der Einwirkung von Oxytocin in den ersten Stunden nach der Injektion eine Steigerung vorangeht; jedenfalls fanden wir im 3 Std nach

der Injektion gesammelten Harn bei manchen Versuchsgruppen eine signifikante Steigerung der ($NH_4^+ + H^+$)-Ausscheidung nach Injektion von 125 mE/Ratte Oxytocin. Da sich diese Steigerung aber bei anderen Gruppen nicht reproduzieren ließ, erübrigt sich eine Angabe der einzelnen Werte.

Diskussion

Diuretische Wirkungen von Oxytocin wurden in früheren Untersuchungen (A. M. Fraser 1937; G. Kuschinsky, H. E. Bundschuh 1939; A. M. Fraser 1942; S. E. Dicker, H. Heller 1946; O. Schaumann 1949) fast immer bei mit relativ kleinen Wassermengen gewässerten Ratten — also im Zustand der submaximalen Wasserdiurese — festgestellt: Das gilt auch für die von A. M. Fraser (1942) gefundene (darüber hinaus in Ermangelung von Angaben über die Größe der Streuung etwas unsichere) Beschleunigung der Wasserausscheidung in der bekannten Versuchsanordnung nach J. H. Burn (1931), die erst beim Abklingen der Wasserdiurese deutlicher wurde, Eine sichere Steigerung der maximalen Wasserdiurese durch Oxytocin konnten wir nicht feststellen: Sie wurde auch von den Untersuchern, die die Wirkung von hochgereinigtem und synthetischem Oxytocin auf die Wasserdiurese zur Aufdeckung einer evtl. antidiuretischen Wirkung des reinen Hormons untersuchten (E. A. Popenoe et al. 1952; L. Gyermek, Gy. Fekete 1955), nicht beobachtet.

Die in unseren Versuchen auftretende Hemmung der Wasserdiurese durch sehr hohe Oxytocindosen möchten wir auf den Vasopressingehalt des verwandten Präparates zurückführen, da seit den Untersuchungen von E. A. Popenoe, J. G. Pierce, V. du Vigneaud und H. B. van Dyke (1952) und trotz der gegenteiligen Befunde von L. Gyermek und Gy. Fekete (1955) (die wohl mit einem nicht ganz reinen Präparat gearbeitet haben) feststeht, daß reinstes Oxytocin nur eine minimale antidiuretische Wirkung hat.

Daß eine eindeutige diuretische Wirkung von Oxytocin in den angeführten älteren Untersuchungen bei geringer Wasserdiurese und in der vorliegenden Untersuchung bei der Diurese nach Wässerung mit isotonischer NaCl-Lösung und — in stärkerem Maß — bei durstenden Ratten festgestellt wurde, spricht für eine umgekehrte Abhängigkeit der diuretischen Oxytocinwirkung von der Größe der Kontrolldiurese. Eine umgekehrte Abhängigkeit scheint für alle bekannten Diuretica zu bestehen.

Besonders bemerkenswert ist die starke diuretische Wirkung von Oxytocin bei durstenden Ratten, die — im Gegensatz zu einem Befund von A. M. Fraser (1942) an leicht gewässerten Ratten — nach Durstperioden bis zu 6 Std eher stärker wird und auch nach 24stündigem Dursten noch nachgewiesen werden kann. Der späte Eintritt (etwa 1 Std nach der s.c.-Injektion) und die lange Dauer (etwa 3 Std) dieser diuretischen Wirkung trennen sie auch zeitlich von den Vasopressinwirkungen, die innerhalb von 10—20 min nach der s.c.-Injektion auftreten und in längstens 1½ Std wieder abklingen.

Da die gleichzeitige Gabe von Vasopressin im maximalen physiologischen Verhältnis von 1 Vasopressin : 4 Oxytocin (V. C. Abrahams, M. Pickford 1954; Harris 1947, 1948; H. Heller 1955) die diuretische Wirkung von Oxytocin eher steigert — eine Hemmung tritt erst in dem derzeit nicht als physiologisch anzusehenden Verhältnis 1 : 1 auf —, hätte eine Ausschüttung von Hypophysenhinterlappenhormonen im Durst bei den Ratten eine Steigerung der Diurese zur Folge. Die Vorstellung, daß die Einschränkung der Diurese im Durst auf einer Ausschüttung von Hypophysenhinterlappenhormonen beruhen könnte, ist mit diesem Befund noch weniger vereinbar als mit der früher beschriebenen Aufhebung der antidiuretischen Wirkung von Vasopressin durch steigenden NaCl-Gehalt der Wässerungs- und damit der Extrazellulärflüssigkeit (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956a).

Eine Klärung des Mechanismus der diuretischen Oxytocinwirkung erscheint zur Zeit noch nicht möglich, da immer noch nicht feststeht, ob und inwieweit die gewöhnlich zur Bestimmung des Glomerulusfiltrats angewandten Inulin- und Kreatinin-Clearancen bei der Ratte diureseabhängig sind. Erwähnt sei, daß S. E. Dikker und H. Heller (1946) nach s. c. Injektion von 30 mE/Oxytocin bei Ratten eine wesentliche Steigerung der Inulin- und der Perabrodil-Clearance gefunden haben, die aber ausschließlich auf die Vasopressinverunreinigung des verwandten Präparats zurückzuführen war: Jedenfalls bewirkten 3 mE/kg Vasopressin (*nicht* aber größere Vasopressindosen) eine ebensogroße Steigerung der beiden Clarancen. Diese Steigerung der Perabrodil- und Inulin-Clearancen durch kleine Vasopressinmengen kann aber zur Erklärung der beobachteten diuretischen Oxytocinwirkungen schon deshalb nicht herangezogen werden, weil kleine Vasopressindosen (entsprechend dem Vasopressingehalt des verwandten Oxytocins) unter unseren Versuchsbedingungen nicht diuretisch, sondern entweder nicht oder sogar ganz leicht antidiuretisch wirkten (vgl. H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956, Tab. 3). Ob zwischen der kürzlich gefundenen (T. W. Demunbrun et al. 1954) spezifischen Normalisierung der PAH- und exogenen Kreatinin-Clearancen posthypophysektomierter Hunde durch Oxytocin und der diuretischen Oxytocinwirkung Beziehungen bestehen, läßt sich schon deshalb nicht entscheiden, weil noch nicht eindeutig feststeht, ob Oxytocin beim Hund diuretisch wirkt (H. C. Ellsworth 1937, A. M. Fraser 1942; M. J. Karvonen, V. Leppänen, M. E. Pitkänen 1953).

Die deutliche Hemmung der antidiuretischen Wirkung von Vasopressin durch kleine und physiologische Mengen von Oxytocin führt zu dem Schluß, daß wahrscheinlich bei allen Vasopressinbestimmungen in Blut und Harn an Hand der antidiuretischen Wirkungen die tatsächlich vorhandene Vasopressinmenge um mehr als eine Zehnerpotenz zu niedrig geschätzt wird. Die Schwierigkeit ließe sich nur umgehen, wenn in Blut und Harn immer gleichzeitig der Oxytocingehalt ermittelt und die gefundene Vasopressinmenge danach korrigiert würde. Eine weniger durch gleichzeitig vorhandenes Oxytocin beeinträchtigte Vasopressinbestimmung könnte vielleicht auf der durch Vasopressin bewirkten Steigerung der Na^+- und Cl'-*Konzentration* im Harn basieren — wenn weitere Untersuchungen unseren Befund bestätigen sollten, daß diese

Steigerung durch Oxytocin nur wenig beeinflußt wird. — Darüber hinaus wirft die Hemmung der Vasopressin-Antidiurese durch Oxytocin die Frage auf, ob in der Genese experimenteller und klinischer Diabetes insipidus-Formen Veränderungen des Oxytocin : Vasopressin-Verhältnisses im Hypophysenhinterlappen*inkret* eine Rolle spielen können.

Die Steigerung der Na^+- und Cl'-Ausscheidung durch Oxytocin erfolgt in ganz anderer Art als bei Vasopressin. Oxytocin steigert nämlich die Salzausscheidung immer im gleichen Sinn und fast immer im gleichen Ausmaß wie die Wasserausscheidung, so daß die Na^+- und Cl'-Konzentrationen im Harn in der Regel nicht verändert werden. Außerdem hält die Steigerung der Na^+- und Cl'-Ausscheidung nach Oxytocin viel länger an als nach Vasopressin.

Obwohl bei manchen Versuchsanordnungen die Na^+-Ausscheidung durch Oxytocin stärker als die Cl'-Ausscheidung gesteigert wird, läßt sich weder aus unseren noch aus älteren Befunden der Schluß (O. Schaumann 1949) ableiten, daß die Steigerung der Cl'-Ausscheidung eine Folge der gesteigerten Na^+-Ausscheidung sein müsse. Ebenso unbegründet erscheint die Annahme, daß die diuretische Wirkung von *Oxytocin* eine Folge der Steigerung der Na^+-Ausscheidung sein müsse. Wir haben früher gezeigt (H. Brunner 1956, G. Kuschinsky, G. Peters), daß die Diurese bei unbehandelten Ratten ,denen lediglich verschiedene NaCl-Mengen gegeben worden waren, der Na^+-Ausscheidung im Harn nicht oder sogar negativ korreliert ist. Das erwähnte Postulat müßte daher dahingehend abgeändert werden, daß *unter Oxytocin* jede Steigerung der Na^+-Ausscheidung gleichzeitig eine Steigerung der Diurese bedingt.

Es erscheint ebensowenig möglich, die diuretische Wirkung von Oxytocin auf eine Steigerung der Ausscheidung osmotisch wirksamer Teilchen pro Zeiteinheit („effectiv osmolarity" oder „urinary osmotic load") zurückzuführen; denn beim intakten normalen Tier und Menschen ist die Diurese nur bei osmotischer Diurese direkt von „urinary osmotic load "abhängig. Die relativ niedrigen — und jedenfalls weit unter den maximal erreichbaren liegenden — Konzentrationen von Na^+- und Cl'- im Harn unserer durstenden oder mit 0,9% NaCl gewässerten Ratten sprechen aber nicht für das Bestehen einer osmotischen Diurese.

Hervorgehoben werden muß das Nachhinken der K^+-Ausscheidung hinter der Na^+- und Cl'-Ausscheidung unter dem Einfluß von Oxytocin besonders deshalb, weil sowohl bei unbehandelten als auch mit Vasopressin behandelten Ratten die K^+-Ausscheidung direkt von der Na^+-Ausscheidung abhängig ist. Das Fehlen einer kaliuretischen Wirkung von Oxytocin wurde schon von O. Schaumann (1949) bei Ratten und von M. J. Karvonen u. Mitarb. (1953) beim Hund beschrieben.

Die Herabsetzung der H^+-Ionen-Sekretion in unseren Versuchen steht in Übereinstimmung mit der von A. M. Fraser (1942) gefundenen Steigerung des Harn-pH. Es erscheint möglich, daß sie nur der Ausdruck einer allgemeinen negativen Korrelation zwischen H^+-Ionen-Sekretion und Wasserausscheidung ist.

Summary

1. The subcutaneous injection of 1 to 50 mU of oxytocin (ot.) per rat has no influence on maximum water diuresis. In rats hydrated with 0.9 per cent saline ot. has a diuretic effect.

2. During thirst ot. has a pronounced diuretic effect in rats. The observed diuresis is a linear function of dosage for ot. doses from 8 to 250 mU per rat, and decreases with higher doses. Prolonged water deprivation enhances the diuretic effect of ot. for periods up to 6 hours. Even thirst periods of 24 hours do not abolish the diuretic effect of oxytocin. The simultaneous injection of vasopressin in doses two to four times smaller than a diuretic dose of ot. enhances the diuretic effect, while equal doses of vpr. and ot. depress the diuretic effect of the latter. — If it is assumed that secretion of vasopressin is always accompanied by secretion of larger amounts of ot. these results do not fit into the concept of limitation of diuresis by hormones of the neurohypophysis during dehydration.

3. The antidiuretic effect of vasopressin in water diuresis is depressed by the simultaneous injection of ot. in doses two to eight times greater than the administered dose of vpr.

4. The injection of ot. increases natriuresis and chloruresis to the same extent as diuresis. There is no reason to assume a cause to effect relationship between the two phenomena. — The effects of vasopressin and of ot. on natriuresis and chloruresius occur at different times after the injection of the hormones, and are additive.

5. The natriuretic and chloruretic effects of ot. are not accompanied by an equal increase in potassium excretion though there may be a short-lasting transitory increase in some groups of animals.

6. Ot. causes a decrease in the total urinary excretion of H^+-ions defined as the sum of ammonium ions and titratable acidity excreted per unit of time.

Literatur

Abrahams, V. C., and M. Pickford: Simultaneous observations on the rate of urine flow and spontaneous uterine movements in the dog, and their relationship to posterior lobe activity J. of Physiol., **126**, 320 (1954). — Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Wirkung von Vasopressin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte bei Veränderungen der Salzkonzentration des Trinkwassers und nach Nierenparenchymresektionen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 434 (1956). — Burn, J. H.,: Estimation of the antidiuretic potency of pituitary (posterior lobe) extract. Quart. J. Pharmacy a. Pharmacol. **4**, 517 (1931). — Cross, B. A.: Suckling antidiuresis in rabbits. J. of Physiol. **114** , 447 (1951). — Cross, B. A., and G. W. Harris: The role of the neurohypophysis in the milk-ejection reflex. J. of Endocrin. **8**, 148 (1952). — Demunbrun, T. W., A. D. Keller, A. H. Levkoff and R. M. Purser jr.: Pitocin restoration of renal hemodynamics to pre-neurohypophysectomy levels. Effect of administering neurohypophyseal extraction products upon the reduced renal functions associated with neurohypophysectomy. Amer. J.

Physiol. **179**, 429 (1954). — Dicker, S. E., and H. Heller: The renal action of posterior pituitary extract and its fractions as analyzed by clearance experiments in rats. J. of Physiol. **104**, 353 (1946). — Ellsworth, H. C : Zitiert nach A. M. Fraser (1937). — Fraser, A. M.: The diuretic action of the oxytocic hormone of the pituitary gland and its effect on the assay of pituitary extracts. J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **60**, 89 (1937). —Fraser, A. M.: The action of the oxytocic hormone of the pituitary gland on urine secretion. J. of Physiol. **101**, 236 (1942). — Gyermek, L., and Gy. Fekete: On the vasopressor and antidiuretic activities of synthetic oxytocin. Experientia (Basel) **11**, 238 (1955). — Harris, G. W.: The excretion of an antidiuretic substance by the kidney after electrical stimulation of the neurohypophysis in the unanesthetized rabbit. J. of Physiol. **107**, 430 (1948a). — Harris, G. W.: Further evidence regarding the endocrine status of the neurohypophysis. J. of Physiol. **107**, 436 (1948b). — Karvonen, M., V. Leppänen and M. E. Pitkänen: The effect of pituitrin, pitressin and pitocin on urinary sodium and potassium excretion in the dog. Ann. Med. Exp. et Biol. Fenniae **31**, 117 (1953). — Kuschinsky, G., u. H. E. Bundschuh :Über eine diuretische und kochsalzausschwemmende Substanz in Hypophysenhinterlappen-Präparaten. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **192**, 683 (1939). — Kuschinsky, G., u. H. Langecker: Diurese, Filtration und Sekretion der Niere unter dem Einfluß verschiedener Pharmaka 1. Der Einfluß der intravenösen Injektion auf die Grunddiurese des Hundes. Arch, exper. Path. u. Pharmakol. **204**, 699 (1947). — Peeters, G.: Zitiert nach H. Heller The active principles of the neurohypophysis. J. Pharmacy a. Pharmacol. **7**, 225 (1955). — Popenoe, E. A., J. G. Pierce, V. du Vigneaud and H. B. van Dyke: Oxytocic activity of purified Vasopressin. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **81**, 506 (1952). — Schaumann, O.: Über den Einfluß von Oxytocin und Vasopressin auf die Ausscheidung von Kalium und Natrium durch die Niere. Experientia, (Basel) **5**, 360 (1949). — Schaumann, O., u. L. Schmidt: Über die Beeinflußung der Wirkung von Oxytocin und Vacopressin auf die Salzdiurese durch Salyrgan. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **205**, 367 (1948).

Professor Dr. G. Kuschinsky, Mainz, Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 474—480 (1956)

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Ciba Aktiengesellschaft Basel

Wirkung von Sexualhormonen auf die Cortison-katalysierte Linolsäureoxydation in vitro

Von
W. Schuler und R. Meier

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. Januar 1956)

Einige der bekannten Corticosteroide vermögen die Autoxydation von Linolsäure in 0,5 m Phosphatpufferlösung mit Tween(20)-Zusatz (1%) bei p_H 7 in vitro stark zu katalysieren. Am wirksamsten ist Cortison, es folgen Hydrocortison, Fluorhydrocortison und 17-Oxy-11-dehydrocorticosteron mit etwa ½ der katalytischen Wirkung von Cortison und 17-Oxy-11-desoxycorticosteron mit eben noch nachweisbarem katalytischem Effekt. Andere Corticoide, vor allem alle mit Essigsäure veresterten, sind katalytisch unwirksam, auch wenn sie unverestert stark wirksam sind. Diese Corticoidkatalyse unterscheidet sich in ihrem zeitlichen Verlaufe von der mit Cytochrom *c* oder mit Haemin katalysierten Linolsäureoxydation, und einige Befunde weisen darauf hin, daß die katalytische Wirkung von Cortison auf die Linolsäureoxydation an das Vorhandensein von Metallionen, speziell Kupferionen, gebunden ist und daß für ihr Zustandekommen die Bildung eines Cortison-$Cu^{\cdot\cdot}$-Komplexes den Ausschlag gibt[2].

Um eine mögliche biologische Bedeutung dieser Befunde zu erkennen, schien es angezeigt, weitere Steroide auf ihre Fähigkeit zu untersuchen, die Linolsäureoxydation zu katalysieren, sowie besonders festzustellen, ob gewisse Steroide die durch Cortison bedingte Katalyse antagonistisch beeinflussen. Dies scheint deshalb von Interesse, weil Corticosteroide verschiedener chemischer Struktur in vivo durchaus verschiedenartige, zum Teil antagonistische Wirkungen besitzen, wie z. B. Cortison und Desoxycorticosteron. Daher wurde auch letzteres als katalytisch unwirksames Corticosteroid mit in den Kreis der Untersuchung verschiedener anderer Steroide einbezogen.

Unter den von uns untersuchten Steroiden fanden wir kein weiteres mit katalytischer Wirkung auf die Autoxydation der Linolsäure. Auch zeigte Desoxycorticosteron bis zu E. K. 10^{-3} keinen antagonistischen Effekt auf die katalysierte Linolsäureoxydation.

Dagegen gelang es unter den Sexualhormonen eine Gruppe von Steroiden zu finden, welche eine starke und spezifische Hemmwirkung

sowohl gegenüber der spontanen, der durch Kupferionen katalysierten, wie auch der Cortison-katalysierten Linolsäureoxydation besitzen, worüber wir im folgenden berichten. Die untersuchten Sexualhormone waren: Oestradiol, Equilenin, Oestron, Progesteron, Testosteron. Zum Vergleich mit den natürlichen Oestrogenen wurden auch die synthetischen Produkte Stilboestrol und Fenocyclin herangezogen.

I. Wirkung der Sexualhormone auf die spontane und die durch Kupferionen katalysierte Linolsäureoxydation

Versuchsanordnung. Die Linolsäureoxydation wurde entsprechend der in der Mitteilung über die Cortisonkatalyse beschriebenen Methode anhand der Sauerstoffaufnahme nach WARBURG bestimmt:

Ges. Flk. Vol. 2,0 ml, O_2 als Gas, 37° C, 20 min Temperatur-Ausgleich, Versuchsdauer 4—5 Std. Ablesung stündlich. Substrat: 5 mg/ml Linolsäure der Fa. Hoffmann-La Roche, Basel. Puffer: 0,5 mol. Phosphat, p_H 6,98 mit 1% Tween 20. Bei den Versuchen mit Cu··-Zusatz wurden 10^{-5} Cu-Ionen (als Kupfersulfat analysenrein) zur Zeit = 0 aus dem Anhang zugekippt. Die Cu··-Menge entspricht dem von uns gefundenen Maximum katalytischer Wirkung. Die zu prüfenden Steroide wurden in den jeweils angegebenen Konzentrationen von Anfang an zur Linolsäure in den Hauptraum gegeben.

Ergebnisse. In den vorliegenden Versuchen ist die *„spontane" Oxydation der Linolsäure* sehr gering und beträgt nur etwa 10—20 μl O_2 in 5 Std. Daher läßt sich lediglich die Konzentration der Steroide angeben, welche notwendig ist, sie aufzuheben.

Oestradiol, Equilenin, Oestron und Diäthylstilboestrol verursachen in E. K. von mindestens $5 \cdot 10^{-5}$ bis 10^{-4} vollständige Hemmung, während Progesteron, Fenocyclin, Testosteron und Testosteron-Propionat die Spontanoxydation der Linolsäure bis zu einer E. K. $5 \cdot 10^{-4}$ nicht beeinflussen.

Die mit 10^{-5} *Cu·· katalysierte Linolsäureoxydation* ergibt einen Mehrverbrauch an Sauerstoff von etwa 120—140 μl in 4 Std. Sie wird durch Oestradiol, Equilenin und Diäthylstilboestrol bei E. K. etwa $5 \cdot 10^{-6}$ bis 10^{-5} beginnend gehemmt, bei etwa E. K. 10^{-4} vollständig aufgehoben. Oestron ist etwas weniger wirksam und hemmt bei 10^{-4} nur etwa 75%. Fenocyclin, Progesteron, Testosteron und dessen Propionat beeinflussen die Cu··-Katalyse dagegen bis zu E. K. $5 \cdot 10^{-4}$ nicht.

In Abb. 1 ist die Hemmwirkung auf die Cu·· (10^{-5}) katalysierte Linolsäureoxydation als Funktion der Steroidkonzentration dargestellt.

Die Hemmung auf die Spontanoxydation und auf die durch Cu·· katalysierte Oxydation der Linolsäure erinnert in gewissem Umfange an die Hemmwirkung von Komplexon. Um die Cu··-Katalyse der Linolsäureoxydation praktisch völlig aufzuheben, ist unter unseren Versuchsbedingungen die dem Cu·· nahezu zweifach äquivalente Komplexonkonzentration nötig. Die vorliegenden Versuche ergeben, daß die Oestradiolhemmung die dem Cu·· 2,3fach aequivalente Konzentration benötigt

und somit etwa von gleicher Größenanordnung ist. Dies würde, unter der Voraussetzung eines gleichen Mechanismus der Hemmung, auf eine nur wenig geringere Affinität von Oestradiol wie von Komplexon zu Kupferionen schließen lassen. Wir können aber vorerst nicht sagen, daß ein derartiger „Komplexmechanismus" die Ursache auch der Oestradiol-Hemmungsreaktion ist. Da auch unbekannt ist, welche Bedeutung der

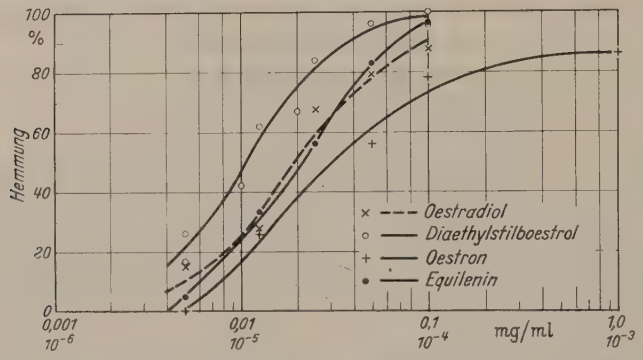


Abb. 1. Hemmung der Cu^{++} (10^{-5})-katalysierten Linolsäureoxydation in %. 4 Std-Werte. Ordinate: % Hemmung. Abszisse: Konzentrationen der Hemmstoffe

von uns verwendeten Pufferlösung zukommt, wie viele Metallionen sie enthält und welche Metalle für die Katalyse in Betracht kommen, lassen sich keine gesicherten Affinitätsrelationen angeben.

II. Wirkung der Sexualhormone auf die durch Cortison katalysierte Linolsäureoxydation

Versuchsanordnung. Als Katalysator der Linolsäureoxydation diente Cortison. Dieses wurde in einer E. K. von 0,5 mg/ml in der 0,5 molaren Phosphatpuffer-Tween(20)-Lösung, wie die Linolsäure, emulgiert und, da sie sich aus dem Anhang der Warburggefäße nur schwer ausspülen läßt, von Anfang an in den Hauptraum der Warburggefäße zur Linolsäure ($5 \cdot 10^{-3}$) gegeben. Die genannte Cortison-Konzentration bedingt eine Sauerstoffverbrauchssteigerung von etwa 280—300 μl in 5 Std.

Damit wurde eine experimentelle Situation gewählt, bei der die Katalyse durch Cortison einerseits stark genug ist, um eine Hemmwirkung deutlich erkennen und messen zu können, andrerseits aber nicht so stark, um einen antagonistischen Effekt zu erschweren.

Ergebnisse: Oestradiol, Diäthylstilboestrol, Equilenin und Oestron hemmen die durch Cortison katalysierte Linolsäureoxydation. Abb. 2 zeigt die Wirkung verschiedener Oestradiolkonzentrationen auf die Cortison-katalysierte Linolsäureoxydation. In Abb. 3 ist die Hemmwirkung aller untersuchten Steroide als Funktion der Hemmstoffkonzentration dargestellt.

Die Hemmwirkung beginnt:

mit Oestradiol bei einer E. K. von mehr als $2{,}5 \cdot 10^{-6}$
Equilenin und
Diäthylstilboestrol „ „ „ „ „ „ $6 \cdot 10^{-6}$
Oestron „ „ „ „ „ „ $1{,}25 \cdot 10^{-5}$

50%ige Hemmung erfolgt

mit Oestradiol bei einer E. K. von $1{,}8 \cdot 10^{-5}$
Diäthylstilboestrol „ „ „ „ $2{,}6 \cdot 10^{-5}$
Oestron „ „ „ „ $4{,}3 \cdot 10^{-5}$
Equilenin „ „ „ „ $5{,}6 \cdot 10^{-5}$

Die Hemmwirkung beträgt 90 oder mehr Prozent, ist also praktisch komplett

mit Oestradiol und
Diäthylstilboestrol in einer E. K. von $8—9 \cdot 10^{-5}$
Equilenin „ „ „ „ $2 \cdot 10^{-4}$
Oestron „ „ „ „ $1 \cdot 10^{-3}$

Progesteron, Fenocyclin, Testosteron und dessen Propionsäureester beeinflussen die Cortisonkatalyse der Linolsäureoxydation bis zu einer E. K. von $5 \cdot 10^{-4}$ nicht. Wie eingangs bereits erwähnt wurde, zeigt auch Desoxycorticosteron, welches die Linolsäureoxydation nicht zu katalysieren vermag, keine Hemmwirkung.

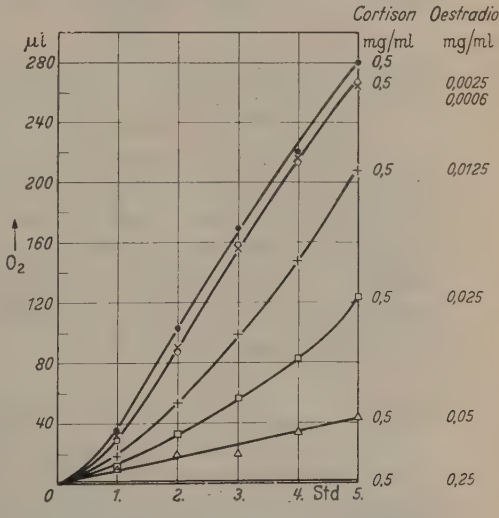


Abb. 2. Wirkung von Oestradiol in verschiedenen Konzentrationen auf die Cortision ($5 \cdot 10^{-4}$)-katalysierte Linolsäureoxydation Ordinate: µl 0_2. Abszisse: Zeit in Stunden

Was die Wirksamkeitsverhältnisse der genannten Hemmstoffe auf die Cortisonkatalyse der Linolsäureoxydation betrifft, kann auch unter diesen experimentellen Gegebenheiten wiederum kein Verhältnis zu einem „katalysierenden Metall" angegeben werden, da dessen Art und Konzentration, wie bereits erwähnt, nicht bekannt ist. Dagegen kann aus der zur vollständigen Aufhebung der Cortison ($5 \cdot 10^{-4}$)-Katalyse notwendigen Menge der hemmenden Steroide auf deren relative Affinität zu dem von uns supponierten Metall-Katalysator im Vergleich zu Cortison geschlossen werden. Es ergibt sich, daß Oestradiol und Diäthylstilboestrol, die in etwa $^1/_5$ der Konzentration des Cortisons vollständige

Aufhebung der Katalyse bedingen, und Equilenin, von dem etwa ½ der Cortisonkonzentration nötig ist, eine größere Affinität zu dem supponierten Katalysator haben als Cortison, daß aber Oestron, das in der doppelten Cortisonkonzentration erst voll aufhebend wirksam ist, nur ½ der Cortisonaffinität zu diesem besitzt. Demgegenüber bedarf es von Komplexon als Hemmstoff der Cortisonkatalyse nur etwa $^1/_{70}$ der Cortisonkonzentration zur vollständigen Hemmung. Dies ist insofern auffallend, als das Verhältnis der Hemmwirkung von Komplexon zu Oestradiol im Falle der reinen Kupferkatalyse etwa das gleiche ist, im

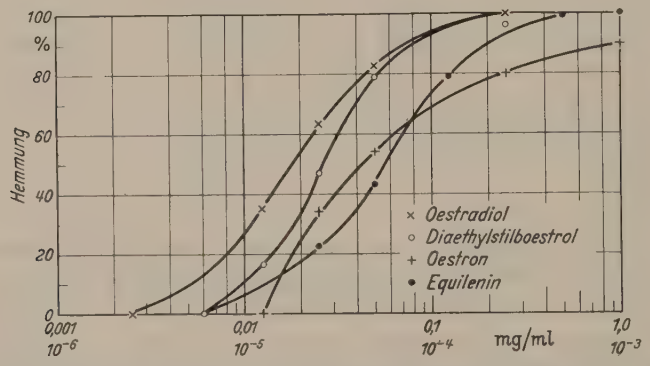


Abb. 3. Hemmung der Cortison ($5 \cdot 10^{-4}$)-katalysierten Linolsäureoxydation in %. 4 Std-Werte. Ordinate: % Hemmung. Abszisse: Konzentrationen der Hemmstoffe

Falle der Cortison bedingten Katalyse Komplexon aber etwa 14mal wirksamer ist als Oestradiol. Es muß wohl daraus geschlossen werden, daß sich in Anwesenheit von Cortison entweder Cu·· als der supponierte Katalysator oder das Oestradiol anders verhalten als ohne Cortison. Möglicherweise kann dies als Hinweis auf die früher geäußerte Annahme gewertet werden, daß für die katalytische Wirkung von Cortison auf die Linolsäureoxydation ein „Cortison-Cu··-Komplex" verantwortlich ist.

Diskussion

Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen führt über das Ergebnis der früher mitgeteilten, daß bestimmte Corticoide die Linolsäureoxydation in vivo stark katalysieren, insofern hinaus als gezeigt wurde, daß eine bestimmte Gruppe von Steroiden mit Sexualhormonwirkung (sowie hormonal ähnlich wirkende Stoffe wie Stilboestrol) die spontane, die durch Cu··, sowie die durch Cortison katalysierte Linolsäureoxydation in ausgesprochenem Maße, also im Sinne von „Antioxydantien", hemmen. Dabei handelt es sich, soweit bisher untersucht, ausschließlich um Steroide oder ähnlich konstituierte Stoffe mit Follikelhormonwirkung. Die Hormonwirkung steht aber wohl mit der „Antioxydanswirkung"

nicht in direktem Zusammenhang, wenn man nicht annehmen will, daß das Fenocyclin seine Hormonwirkung auf einem indirekten oder differenten Wege auslöst. Offenbar hängt die Hemmwirkung vor allem von einer bestimmten chemischen Struktur ab, und es wird notwendig sein, noch andere chemische Homologe mit und ohne spezieller Hormonwirkung zu untersuchen.

Es ist möglich, daß den gefundenen Hemmstoffen grundsätzlich eine komplexbildende Wirkung auf Metallionen zukommt und daß diese Steroid-Metallkomplexe katalytisch unwirksam sind, im Gegensatz zu den supponierten Metall-Corticoidkomplexen mit starker oxydationskatalytischer Wirkung. Unterlagen über derartige Metallkomplexe von Steroiden scheinen vorläufig in der Literatur nicht vorzuliegen; es sollte daher die Komplexbildungstendenz von Steroiden mit Metallen und metallhaltigen Katalysatoren untersucht werden.

Es ist aber durchaus möglich, daß der beschriebene antikatalytische Effekt bestimmter Steroide nicht oder nicht nur auf Metall-Komplexbildung beruht, sondern daß diese Stoffe in anderer Weise in den Mechanismus bestimmter Oxydationskatalysen eingreifen. Eine Möglichkeit zur Analyse dieser Frage wären Untersuchungen über die Hemmwirkung dieser Substanzen auf andere metallkatalysierte Reaktionen, auf welche Fragen wir in absehbarer Zeit hoffen zurückkommen zu können.

Wir möchten darauf verzichten, aus den Befunden einer katalysierenden Wirkung von Corticosteroiden auf die Oxydation einer ungesättigten Fettsäure und der antikatalytischen Wirkung bestimmter Hormonsteroide auf die gleiche Reaktion hypothetische Schlüsse auf Verhältnisse im tierischen Organismus zu ziehen. Eine Lipoxydase für ungesättigte Fettsäuren mit vermutlich ähnlichem Reaktionsmechanismus ist in pflanzlichem Gewebe gefunden worden, während Angaben über den tierischen Organismus spärlich sind, hier sollen Haemoproteide eine der Lipoxydase ähnliche Wirkung entfalten[1]. Wichtig scheint, daß es gelungen ist, den Einfluß von Steroiden auf katalytische Reaktionen nachzuweisen, an denen sie selbst zunächst nicht direkt beteiligt sind. Dies könnte immerhin einen prinzipiell wichtigen Schritt in der Kenntnis derartiger Reaktionen darstellen.

Zusammenfassung

Im Anschluß an Befunde über die katalytische Wirkung bestimmter Corticoide, besonders Cortison, auf die Autoxydation der Linolsäure in vitro wird die Frage geprüft, ob Steroide antikatalytische Wirkung bei dieser Reaktion besitzen.

Steroide mit Follikelhormonwirkung, Oestradiol, Equilenin, Oestron, sowie ähnlich wirkende Stoffe wie Diäthylstilboestrol, zeigen eine ausgesprochen hemmende Wirkung auf die spontane, die mit Kupferionen

und die mit Cortison katalysierte Linolsäureoxydation. Im letzteren Falle beginnt die Hemmwirkung bei E. K. $3—6 \cdot 10^{-6}$ und ist bei E. K. etwa 10^{-4} vollständig.

Bezogen auf die Cortisonmenge haben Oestron etwa die ½fache, Equilenin die etwa 2fache, Oestradiol und Stilboestrol die etwa 5fache, Komplexon aber die etwa 70fache „antagonistische" Wirksamkeit. Fenocyclin zeigt diese Hemmwirkung nicht.

Progesteron, Testosteron und Testosteron-propionat sind bis zu E. K. $5 \cdot 10^{-4}$ unwirksam.

Literatur

[1] Franke, W.: Autoxydation und enzymatische Oxydation der ungesättigten Fettsäuren. Erg. d. Enzymforschung XII 89—168, spez. 122 (1951). — [2] Schuler, W. u. R. Meier: Katalysierende Wirkung von Cortison und anderen Nebennierenrindensteroiden auf die Autoxydation von Linolsäure in vitro. Hoppe-Seylers Z. **302**, 236, 1955.

Professor Dr. Rolf Meier, Wissenschaftl. Laboratorien d. Ciba AG., Basel/Schweiz

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, 481—492 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Frankfurt a. M.
(Direktor: Prof. Dr. P. Holtz)

Zur Pharmakologie und Toxikologie des Cholins

Von
K. Greeff, E. Westermann und G. Bohné*

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. Januar 1956)

Tödliche Vergiftungen mit Cholin, das peroral oder in Form intravenöser Dauertropfinfusionen bei Lebererkrankungen therapeutische Anwendung findet, sind unseres Wissens bisher nicht beschrieben worden. Bei der *therapeutischen* Anwendung wurden nicht selten Speichelfluß, Erbrechen, Schwindel und Kreislaufstörungen als Nebenwirkungen beobachtet und als Ausdruck der *muscarinartigen* Wirkung des Cholins gedeutet (z. B. Seidl, Seckfort u. Trojan). Aber schon die Untersuchungen R. Boehms, die sich u. a. mit dem Mechanismus des nach tödlichen Dosen am Tier auftretenden Atemstillstandes befassen, lassen erkennen, daß auch der vor allem durch Dale bekannten *nicotinartigen* Wirkungskomponente für die Wirkung hoher Dosen Bedeutung zukommt (Übersicht bei Trendelenburg). Der „nicotinartige" Charakter der nach höheren Cholindosen auftretenden Blutdrucksteigerung ist in letzter Zeit von Forst bezweifelt worden, da diese sich durch eine Dauerinfusion ganglienblockierenden Nicotins nicht verhindern ließ, wohl aber durch Atropin.

Diese offenbar noch bestehenden Unklarheiten sowie ein Fall tödlicher Cholinvergiftung gaben die Veranlassung zu den im folgenden mitgeteilten Versuchen.

Einem 51 Jahre alten Patienten, der wegen einer Cholecystitis in stationäre Behandlung kam, sollte eine Mischspritze von 10 cm³ *Decholin* und 10 cm³ *Protocid* intravenös gegeben werden. Die Stationsschwester verstand statt „Decholin" „Cholin" und bereitete eine Spritze vor, indem sie neben 10 cm³ Protocid 10 cm³ Cholin. chloratum „Merck" (20%ig) aufzog und zur Kontrolle nur die leere Protocid-Ampulle über die Kanüle stülpte. Nach Injektion von etwa 7 cm³ (etwa 700 mg Cholin) der Lösung erlitt der Patient einen schweren Kollaps, dem kurze Zeit später der Tod folgte, ohne daß noch Gegenmaßnahmen möglich gewesen wären (Bohné).

Versuche

Methodik. Versuche an 16 Katzen und 24 Ratten wurden in Pernocton- bzw. Urethannarkose durchgeführt. Die *Blutdruckregistrierung* erfolgte durch ein Hg-Manometer in der A. carotis, die Registrierung der *Atmung* durch eine in die

* Assistent am Institut für gerichtliche Medizin der Universität Frankfurt a. M.

Trachea eingeführte Kanüle mit Hilfe einer Marey'schen Kapsel. — Das *Mechanogramm* des M. gastrocnemius und des Zwerchfells wurde bei direkter und indirekter elektrischer Reizung mit Rechteckimpulsen in isotonischer Anordnung registriert. Versuche am isolierten *Phrenicus-Zwerchfellpräparat* der Ratte wurden in der Anordnung nach Bülbring in einem Tyrodebad von 40 cm³ durchgeführt. — Das *isolierte* Herzvorhofpräparat suspendierten wir in der von Holtz u. Westermann beschriebenen Weise in einem Tyrodebad von 20 cm³. — Toxicitätsbestimmungen (DL 50) wurden bei 25° C an Gruppen von je 6 weißen Mäusen gleichen Stammes (18 bis 22 g) durchgeführt.

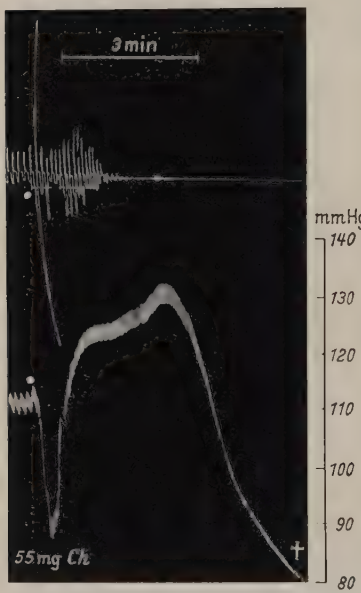


Abb. 1. Die Wirkung hoher Cholindosen auf Blutdruck und Atmung. Katze 2,7 kg. Pernoctonnarkose. Oben: Atmung; Unten: Blutdruck. *Ch* Cholinchlorid

1. Die Wirkung des Cholins auf Kreislauf und Atmung

An der narkotisierten *Katze* verursacht die intravenöse Injektion kleiner Cholindosen (100 γ/kg) eine flüchtige Blutdrucksenkung. Nach größeren Dosen (1 mg/kg) folgt einer 1—2 min lang andauernden Blutdruck*senkung* eine geringe Blutdruck*steigerung*, die bei noch höherer Dosierung (10 mg/kg) gegenüber der Blutdrucksenkung sehr viel stärker ausgeprägt ist. Auch letale Cholindosen (50—60 mg/kg) haben diese biphasische Blutdruckwirkung. Im Anschluß an die sekundäre Blutdrucksteigerung kommt es dann allerdings erneut zu einem starken Blutdruckabfall mit Bradykardie und Speichelfluß und zum Tode des Tieres (Abb. 1).

Schon kleine Cholindosen verursachen ein kurzdauerndes Sistieren der *Atmung*. Nach großen Dosen kommt es zu vollständigem Atemstillstand. Dieser geht dem finalen Blutdruckabfall voraus (Abb. 1).

In weiteren Versuchen sollte festgestellt werden, ob die tödliche Wirkung sonst letaler Dosen (50—60 mg/kg) sich durch *Atropin* oder *künstliche Atmung* verhindern läßt. *Atropin* (1 mg/kg) hob erwartungsgemäß die blutdrucksenkende und bradykarde Wirkung des Cholins vollständig auf und verstärkte die blutdruck*steigernde* Wirkung. Trotzdem trat wie an der nicht-atropinisierten Katze nach Injektion von 50 bis 60 mg/kg regelmäßig der Tod ein. Wurden die atropinisierten Tiere dagegen künstlich beatmet, so überlebten sie und starben erst nach 5 bis 10fach höheren Dosen.

In dem Versuch der Abb. 2 führten an der atropinisierten und künstlich beatmeten Katze 10 mg/kg Cholin zu einem Blutdruckanstieg von

40 mm Hg. Dieser entsprach der pressorischen Wirkung von 10 γ/kg Adrenalin. Die sonst letale Cholindosis von 50 mg/kg verursachte einen Blutdruckanstieg von etwa 55 mm Hg, wurde aber überlebt. Erst die weitere Injektion einer 6fach höheren Cholindosis (300 mg/kg) führte trotz Atropin und künstlicher Atmung im Verlauf von etwa 20 min unter langsamem Blutdruckabfall und Bradykardie zum Tode. Durch künstliche Atmung allein ohne vorherige Atropinisierung wurde die Dosis letalis nur auf das 2—3fache erhöht.

Zu prinzipiell gleichen Ergebnissen führten Versuche an *Ratten*: die tödliche Cholindosis lag auch hier bei 50 mg/kg Körpergewicht; Atropin

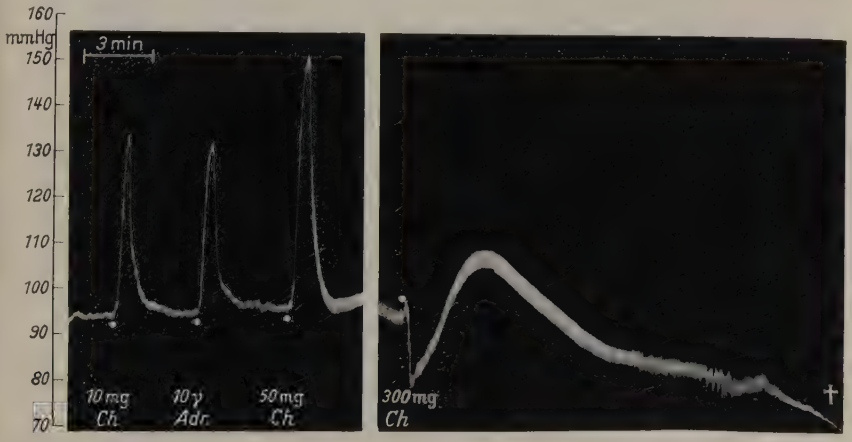


Abb. 2. Die Wirkung hoher Cholindosen am atropinisierten und künstlich beatmeten Tier. Katze 1,8 kg. Pernoctonnarkose, Atropin 1 mg/kg, künstliche Atmung. *Ch* Cholinchlorid. *Adr* Adrenalin

vermochte den Tod nicht zu verhindern. Bei künstlicher Beatmung und vorheriger Gabe von Atropin wurden mehrfach höhere Dosen vertragen.

Aus den bisherigen Versuchen darf geschlossen werden, daß durch *Atropin* zwar die parasympathischen Wirkungen des Cholins aufgehoben werden können, daß aber nur bei *künstlicher Beatmung* sonst tödliche Cholindosen überlebt werden. Die tödliche Wirkung des Cholins am narkotisierten Tier scheint demnach weniger auf einem Versagen des Kreislaufs als auf einer Lähmung der Atmung zu beruhen.

2. Die Wirkung des Cholins auf die neuromuskuläre Erregungsübertragung

Um festzustellen, ob die Atemlähmung *zentral* oder *peripher* bedingt ist, haben wir untersucht, ob tödliche Cholindosen zu einer Lähmung der quergestreiften Muskulatur führen. In dem Versuch der Abb. 3A wurden an der narkotisierten Ratte gleichzeitig mit dem Blutdruck die Atmung und das *Mechanogramm* des indirekt gereizten M. gastrocnemius registriert.

Nach Injektion von 100 mg/kg Cholin kam es mit dem Atemstillstand zu einer starken Hemmung der elektrisch ausgelösten Kontraktionen des M. gastrocnemius. Bei Einleitung künstlicher Atmung stieg der abgesunkene Blutdruck wieder an, während die Erregbarkeit des M. gastrocnemius weiterhin abnahm. Wenn auch aus diesem Versuch hervorgeht, daß *tödliche* Cholindosen sowohl die Atmung als auch den M.

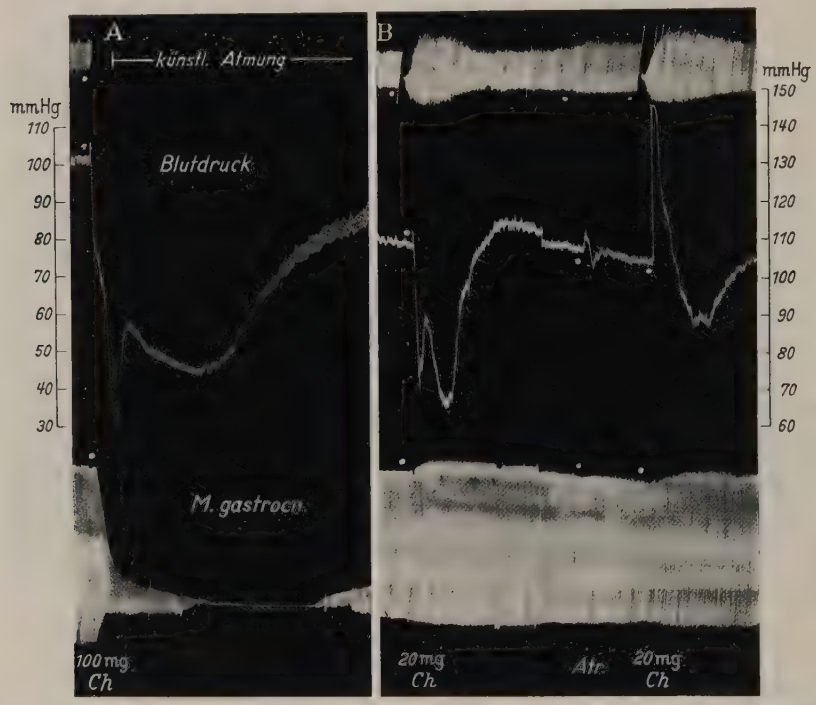


Abb. 3. Die Wirkung des Cholins auf die Atmung und die neuromuskuläre Erregungsübertragung (siehe Text). A. Ratte 340 g; B. Ratte 350 g: Urethannarkose. M. gastrocnemius: Mechanogramm bei Reizung des N. ischiadicus 0,15 Hz, 1 msec, 30 Milliamp. *Ch* Cholinchlorid. *Atr* 1 mg/kg Atropin. sulf.

gastrocnemius lähmen, so kann doch nach *niedrigeren* Cholindosen bereits eine Atemhemmung beobachtet werden, ohne daß es zu einer nachweisbaren Hemmung im Mechanogramm des M. gastrocnemius käme. In dem Versuch der Abb. 3 B verursachten 20 mg/kg Cholin einen kurzdauernden Atemstillstand, am M. gastrocnemius aber keinerlei Hemmung.

Die Atemlähmung kann nicht durch die nach Cholin auftretende starke Blutdrucksenkung erklärt werden, denn sie kommt auch zustande, wenn Cholin nach Atropin nicht mehr blutdruck*senkend*, sondern blutdruck*steigernd* wirkt.

Es ist bekannt, daß die Empfindlichkeit der Atem- und Skeletmuskulatur gegenüber Muskelrelaxantien verschieden ist. So können z. B. bei manchen Cholinestern die Quotienten der Dosen, die zur Lähmung der

Atemmuskulatur bzw. Skeletmuskulatur erforderlich sind, verschieden sein (Engelhardt, Greeff, Richter u. Schümann). In Versuchen an *Katzen* haben wir gleichzeitig das Mechanogramm des *M. gastrocnemius* bei elektrischer Reizung des N. ischiadicus und das Mechanogramm des *Zwerchfells* bei Reizung des N. phrenicus registriert. Dabei ergab sich, daß auch beim Cholin ähnlich wie bei seinen Estern die lähmende Wirkung am Skeletmuskel stärker ist als an der Zwerchfellmuskulatur. Der Versuch in Abb. 4 zeigt, daß der Unterschied zwar nicht so groß ist wie beim *Succinylcholin*, daß aber eine Cholindosis von 50 mg/kg, die den M. gastrocnemius fast vollständig blockiert, das Zwerchfell deutlich weniger hemmt. Zur vollständigen Lähmung des Zwerchfells waren etwa *doppelt* so hohe Cholindosen notwendig wie zur Lähmung des M. gastrocnemius; beim Succinylcholin sind hierzu *3fach* höhere Dosen erforderlich.

Abb. 4. Die Wirkung des Cholins auf die indirekte Erregbarkeit der Atem- und Skeletmuskulatur. Katze 2,2 kg. Pernoctonnarkose. Oben: Mechanogramm des Zwerchfells. Unten: Mechanogramm des M. gastrocnemius. Elektrische Reizung des N. phrenicus (intrathorakal) und des N. ischiadicus 0,15 Hz, 1 msec, 25 Milliamp. *Sch* 150 γ Succinylcholinchlorid. *Ch* 50 mg Cholinchlorid

Am isolierten *Rattenzwerchfell* war Cholin 30—60mal weniger wirksam als Succinylcholin. Wie Acetyl- und Succinylcholin, so setzt auch Cholin nur die *indirekte*, nicht die *direkte* Erregbarkeit des Muskels herab.

Aus diesen Versuchen ergibt sich somit für die Erklärung der die Atmung lähmenden Wirkung tödlicher Cholindosen, daß diese *peripher* bedingt ist, indem Cholin eine Blockierung der neuromuskulären Erregungsübertragung im Bereich der Atemmuskulatur verursacht, wozu allerdings doppelt so hohe Dosen erforderlich sind als für die Aufhebung der indirekten Erregbarkeit des Skeletmuskels. — Nicht erklärt ist damit die nach kleineren, subletalen Cholindosen auftretende kurzdauernde *Apnoe*. Diese kann nicht peripher, d. h. durch eine neuromuskuläre Blockierung der Atemmuskulatur bedingt sein; denn die kleinen, zu Apnoe führenden Cholindosen lassen selbst das Mechanogramm des *Skeletmuskels*, der doppelt so empfindlich wie die Atemmuskulatur ist, vollkommen intakt oder verbessern es sogar (vgl. Abb. 3B). In Versuchen an der Katze und Ratte fanden wir, daß 5—10 γ/kg Adrenalin einen

ähnlichen kurzdauernden Atemstillstand verursachen wie 20—40 mg/kg Cholin. Die nach kleinen Cholindosen auftretende Apnoe ist deshalb wahrscheinlich keine *direkte* Cholinwirkung, sondern hat ihre Ursache in einer Ausschüttung von *Adrenalin* aus den Nebennieren, wie sich auch aus den folgenden Versuchen ergibt.

3. Die blutdrucksteigernde Wirkung des Cholins

Die blutdrucksteigernde Wirkung größerer Cholindosen wird seit den Untersuchungen Dales als „nicotinartig" bezeichnet und mit einer Stimulierung sympathischer Ganglien und des Nebennierenmarks erklärt. Wie die gleichartige

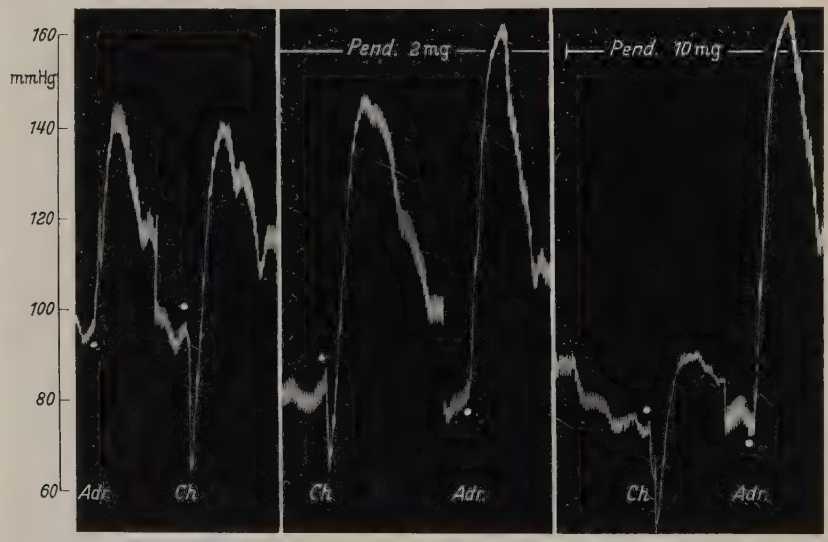


Abb. 5. Einfluß eines Ganglienblockers auf die pressorische Wirkung des Cholins. Katze 2,2 kg. Pernoctonnarkose. *Adr* 1 γ/kg Adrenalin. *Ch* 5 mg/kg Cholinchlorid. *Pend* Pendiomid intravenös

Wirkung höherer Acetylcholindosen ließ sie sich durch Atropin, das die blutdrucksenkende, *muscarinartige* Wirkungskomponente ausschaltet, verstärken und durch anschließend verabfolgtes Nicotin aufheben.

Das steht in einem gewissen Gegensatz zu vor einigen Jahren von Forst veröffentlichten Befunden, die ihn zu der Annahme führten, die pressorische Cholinwirkung sei nicht nicotinartigen, sondern eher „vagomimetischen" Charakters, da in Versuchen an Katzen die pressorische Wirkung einer bestimmten Cholindosis (5 mg/kg) auch während der intravenösen Dauerinfusion von *Nicotin* bestehen blieb und erst durch zusätzlich verabfolgtes Atropin aufgehoben wurde.

Die Abb. 5 zeigt zunächst, daß die durch 5 mg/kg Cholin verursachte Blutdrucksteigerung nach der Injektion eines Ganglienblockers — 2 mg/kg *Pendiomid* (N,N,N′,N′-3-Pentamethyl-N,N′-diäthyl-3-aza-pentylen-1,5-diammonium-dibromid) — nicht abgeschwächt, sondern sogar etwas verstärkt wird. Gleichzeitig ist auch die Adrenalinwirkung deutlich

verstärkt. Eine höhere Pendiomiddosis (10 mg/kg) *verhindert* die pressorische Wirkung des Cholins, während die Adrenalinwirkung weiter verstärkt wird. Die Erklärung dürfte sein, daß die *kleine* Pendiomiddosis zur vollständigen Blockade der Ganglien und des Nebennierenmarks nicht ausreichte, andererseits aber den Kreislauf für Adrenalin und Noradrenalin so stark sensibilisierte, daß jetzt auch kleinere, durch Cholin freigesetzte Mengen an Sympathicusstoffen genügten, um eine gleich starke oder sogar stärkere Wirkung als vorher zu verursachen. Die *große* Pendiomiddosis dagegen führte offenbar zu einer so vollständigen Blockade der Ganglien und des Nebennierenmarks, daß die verabfolgte Cholindosis trotz der sensibilisierten Peripherie wirkungslos blieb.

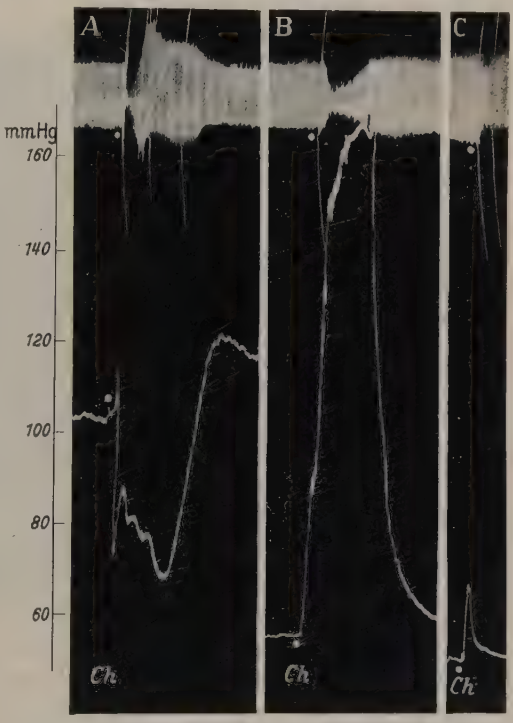


Abb. 6. Beeinflussung der Cholinwirkung durch Ganglienblocker und Sympathicolyticum. Ratte 250 g. Urethannarkose. *Ch* 30 mg/kg Cholinchlorid. B: nach intravenöser Injektion von 10 mg/kg Hexamethonium. C: nach zusätzlicher intravenöser Injektion von 10 mg/kg Regitin

Der *„sympathicomimetische"* Charakter der pressorischen Cholinwirkung geht besonders deutlich aus dem Versuch der Abb. 6 hervor. In diesem Versuch an der Ratte wurde die blutdruck*senkende* Wirkung einer hohen Cholindosis (30 mg/kg) durch 10 mg/kg Hexamethonium, die offensichtlich — ähnlich wie 2 mg/kg Pendiomid im vorigen Versuch — zur Sensibilisierung der Kreislaufperipherie gegen Adrenalin, nicht jedoch zur vollständigen Blockade der Ganglien ausreichten, in eine rein pressorische Wirkung umgewandelt. Diese nun läßt sich durch ein Sympathicolyticum — *Regitin* (2-(N-p-Tolyl-N-m-oxyphenylaminomethyl)-imidazolin) — praktisch vollkommen aufheben.

In gleicher Weise wie in der Abb. 5 nach 2 mg/kg Pendiomid eine unvollständige Blockade der Ganglien sich durch eine zusätzliche Pendiomiddosis (1 mg/kg) vervollständigen ließ, ist das auch mit *Atropin*

möglich. In der Abb. 7A hatten 10 mg/kg Cholin nach Verabfolgung von 2 mg/kg Pendiomid eine zwar abgeschwächte, aber noch deutliche blutdrucksteigernde Wirkung. Diese wurde durch die kleine Dosis von 100 γ/kg Atropin vollständig aufgehoben.

Auch ohne vorherige Verabfolgung eines Ganglienblockers vermag *Atropin* die pressorische Cholinwirkung abzuschwächen (Abb. 7B). In

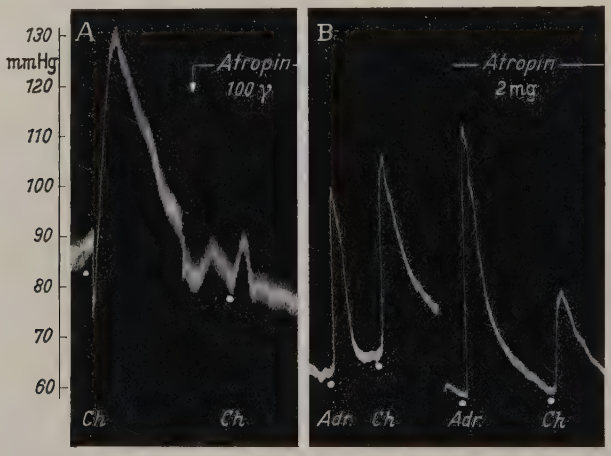


Abb. 7. Hemmung der blutdrucksteigernden Cholinwirkung durch Atropin (siehe Text). A. Katze 2 kg. Pernoctonnarkose, künstliche Atmung. Vorher 2 mg/kg Pendiomid i.v. — *Ch* 10 mg/kg Cholinchlorid. B: Ratte 300 g. Urethannarkose, künstliche Atmung. Vorher 100 γ/kg Atropin. sulf. — *Ch* 30 mg/kg Cholinchlorid. *Adr* 1 γ/kg Adrenalin

diesem Versuch an der Ratte waren zunächst 100 γ/kg Atropin zur Aufhebung der muscarinartigen Wirkung des Cholins gegeben worden. 30 mg/kg Cholin wirkten deshalb rein pressorisch und zwar etwas stärker als 1 γ/kg Adrenalin. Die zusätzliche Verabfolgung einer höheren Atropindosis (2 mg/kg) *schwächt* die Cholinwirkung ab und *verstärkt* die Adrenalinwirkung.

In Bestätigung der Beobachtung von Forst fanden auch wir somit, daß die pressorische Cholinwirkung sich durch Atropin abschwächen bzw. aufheben läßt. Es ist aber bekannt, daß Atropin die ganglionäre Erregungsübertragung hemmt (siehe z. B. Bacq u. Frédericq; Feldberg u. Vartiainen; Cahen u. Trede). Die Abschwächung oder Aufhebung der blutdrucksteigernden Wirkung des Cholins durch Atropin wäre demnach wohl nicht als „Antimuscarinwirkung", sondern als „Antinicotinwirkung" zu deuten in dem Sinne, daß sie die nicotinartige ganglionäre Erregungswirkung des Cholins aufhebt. Bemerkenswert ist hierbei, daß nach Vorbehandlung mit einem Ganglienblocker schon sehr kleine Atropindosen hierzu genügen (vgl. Abb. 7B). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß in den Versuchen von Forst die intravenöse Nicotininfusion eine nur unvollständige Blockade der Ganglien bewirkte, die dann durch Atropin komplettiert wurde. Dagegen würde auch nicht sprechen, daß während der Nicotininfusion akut injiziertes Nicotin

wirkungslos blieb, da das kein Beweis für eine vollständige Blockierung der Ganglien wäre, sondern nur ein weiteres Beispiel für die bekannte *Tachyphylaxie* der Nicotinwirkung (siehe hierzu auch Busse, Wolf u. Lendle).

4. Muscarinähnliche und nicotinähnliche Wirkungen des Cholins am isolierten Darm und Vorhof

a) Der isolierte *Kaninchendarm* wird durch Cholin ähnlich wie durch Acetylcholin und Nicotin erregt. Der Ganglienblocker Pendiomid, der die

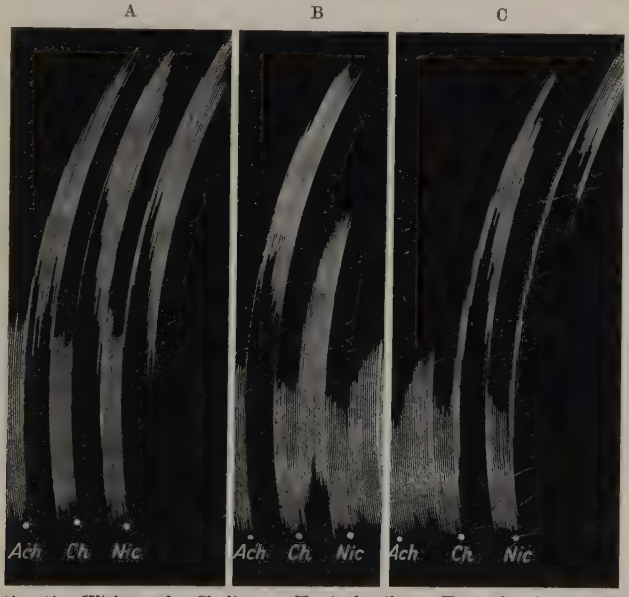


Abb. 8. Nicotinartige Wirkung des Cholins am Kaninchenileum. Kaninchenileum in 20 cm³ Tyrode: *Ach* 0,3 γAcetylcholin. *Ch* 1,2 mg Cholin. *Nic* 20 γNicotinbitartrat. B: Pendiomid 1:10000 C: Atropin 1:1000000

Nicotinwirkung vollständig aufhebt, schwächt auch die Erregungswirkung des *Cholins* — im Gegensatz zur Acetylcholinwirkung — stark ab. Demgegenüber wird sie durch *Atropin* kaum beeinflußt (Abb. 8). Die Erregungswirkung des Cholins am Kaninchendarm ist also wenigstens ganz überwiegend eine nicotinartige.

b) Am isolierten *Kaninchen-* und *Meerschweinchenvorhof* haben wir die Wirkung des Cholins mit der des Acetylcholins und Butyrylcholins verglichen. Frühere Versuche unseres Institutes (Holtz u. Westermann) hatten ergeben, daß der Buttersäureester am Vorhofpräparat eine sehr viel stärkere nicotinartige Wirkung besitzt als der Essigsäureester. Butyrylcholin hat deshalb eine überwiegend *positiv* inotrope und chronotrope, Acetylcholin eine rein *negative* inotrope und chronotrope Wirkung. Cholin wirkt — wenn auch in sehr viel höherer Dosierung — rein muscarinartig.

Nach Ausschaltung der muscarinartigen Wirkung der Cholinester durch Atropin tritt die nicotinartige Wirkung — beim Acetylcholin erst bei höherer Dosierung — in Erscheinung. Doch verursachen selbst 100 mg Cholin noch keine nicotinartige Erregung (Abb. 9).

Bemerkungen

Für die Beantwortung der Frage nach der *Ursache* der *tödlichen* Wirkung hoher Cholindosen geben unsere Untersuchungen folgende Anhaltspunkte: neben den muscarinartigen sind die nicotinartigen Effekte von

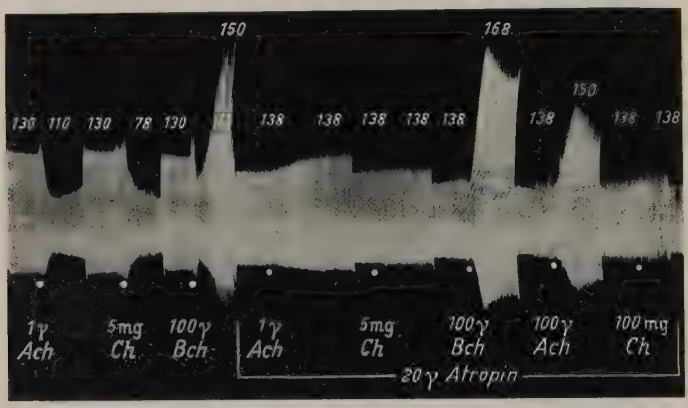


Abb. 9. Isoliertes Herzvorhofpräparat in 20 cm³ Tyrode. (Meerschweinchen). *Ach* Acetylcholin. *Bch* Butyrylcholin. *Ch* Cholin

mindestens ebenso großer Bedeutung. Diese spielen sich einmal im Bereich der *Ganglien* und des *Nebennierenmarkes* ab und verursachen als *indirekte* adrenergische Wirkung Blutdruckanstieg und Apnoe. Die *direkten* „nicotinartigen" Wirkungen führen im Bereich der quergestreiften Muskulatur zum neuromuskulären Block, der auch die Atemmuskulatur betrifft und damit zur eigentlichen Ursache des Todes werden kann. Damit im Einklang steht, daß die Versuchstiere bei künstlicher Beatmung mehrfach tödliche Dosen überleben.

Bei einer durch akute Überdosierung verursachten Cholinvergiftung muß deshalb die atmungslähmende Wirkung besonders beachtet werden. Der neuromuskuläre Block im Bereich der Atmungsmuskulatur, der dieser Wirkung zugrunde liegt, läßt sich *pharmakologisch* nicht sicher beeinflussen. Esterasehemmer wie *Eserin* und *Prostigmin* wären direkt kontraindiziert, da sie die depolarisierende Cholinwirkung noch verstärken würden. Die Einleitung künstlicher Atmung könnte deshalb von lebensrettender Bedeutung sein.

Pharmakotherapeutisch käme neben einer Ausschaltung der muscarinähnlichen Wirkungen durch Atropin vor allem eine Dämpfung der

nicotinartigen — indirekt adrenergischen — Wirkungen durch Ganglienblocker oder Sympathicolytica in Frage.

Das Ergebnis unserer an weißen Mäusen durchgeführten Versuche, die *Toxicität* des Cholins durch vorherige Dämpfung bestimmter Strukturen des vegetativen Nervensystems zu vermindern, ist in der Tab. 1 dargestellt: *Atropin* allein vermochte die DL 50 nicht signifikant zu erhöhen. Das steht im Einklang damit, daß auch in unseren Versuchen an

Tabelle 1. *Pharmakologische Beeinflussung der Toxicität des Cholins (DL 50).* (Versuchsanordnung siehe Methodik.) Die eingeklammerten Zahlen bedeuten die untere und obere Grenze der Streuung mit $^{19}/_{20}$ Wahrscheinlichkeit, berechnet nach Litchfield und Wilcoxon

DL 50 Cholinchlorid mg/kg i.v. 15 min nach 10 mg/kg i. p.				
—	Atropin	Regitin	Buscopan	Hexamethonium
40 (35,6—44,8)	48 (42,0—54,6)	56 (47,3—66,2)	60 (47,5—75,5)	168 (132—214)

narkotisierten Tieren die tödliche Cholinwirkung sich durch Atropin nicht beeinflussen ließ. Im Gegensatz hierzu führten *Regitin* und *Buscopan* (Hyoscin-N-butylbromid) zu einer zwar geringen, aber signifikanten Erhöhung der DL 50. Weitaus am wirksamsten erwies sich *Hexamethonium*, das die DL 50 um 420% erhöhte.

Diese günstige Wirkung dürfte nicht nur auf einer Blockade der vegetativen Ganglien beruhen, sondern auch dadurch bedingt sein, daß Hexamethonium den durch Cholin verursachten neuromuskulären Block antagonistisch beeinflußt. Versuche am isolierten Zwerchfellpräparat ergaben, daß 5 mg Hexamethonium die neuromuskuläre Hemmungswirkung von 20 mg Cholin fast vollständig verhinderten. Auch am M. gastrocnemius der Ratte in situ ließ sich die Cholinhemmung durch vorherige Verabfolgung von Hexamethonium deutlich abschwächen.

Zusammenfassung

1. An narkotisierten Katzen und Ratten ist die tödliche Wirkung hoher intravenöser Cholindosen wesentlich durch eine *Lähmung* der *Atmung* bedingt. Dieser liegt eine Blockierung der neuromuskulären Erregungsübertragung zugrunde. Bei künstlicher Beatmung werden sonst tödliche Dosen überlebt.

2. Die blutdruck*steigernde* Wirkung höherer Cholindosen läßt sich durch *Atropin* abschwächen oder aufheben. Das spricht aber nicht gegen den *nicotinartigen* Charakter dieser Wirkung, die auf der Erregung sympathischer Ganglien und einer Adrenalinausschüttung aus dem Nebennierenmark beruht, sondern für eine ganglionär blockierende — Antinicotinwirkung — des Atropins.

3. In Versuchen an weißen Mäusen ist die DL 50 des Cholins nach Vorbehandlung mit Atropin nicht signifikant erhöht. Regitin, Buscopan, am deutlichsten aber Hexamethonium vermindern die Giftigkeit.

Literatur

Bacq, Z., et H. Fredericq: Arch. internat. Physiol. **40**, 297 (1934). — Boehm, R: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **74**, 119 (1913). — Bohné, G.: Arch. Toxikol. **16**, 1 (1956). — Bülbring, E.: J. Pharmacol. **1**, 38 (1949). — Busse, W., J. Wolf u. L. Lendle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 177 (1953). — Cahen, L., et K. M. Trede: Arch. internat. Pharmacodynamie **94**, 248 (1953). — Dale, H. H.: J. of Pharmacol. **6**, 147 (1914/15). — Engelhardt, A., K. Greefe, W. Richter u. H. J. Schümann: Arch exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 541 (1955). — Feldberg, W., and A. Vartiainen: J. of Physiol. **83**, 103 (1935). — Forst, A. W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **201**, 261 (1943). — Holtz, P., u. E. Westermann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 421 (1955). — Litchfield, J. T., and F. Wilcoxon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 99 (1949). — Seckfort, H., u. H. J. Trojan: Klin. Wschr. **29**, 705 (1951). — Seidl, G.: Dtsch. med. Wschr. **14**, 5 11 (1949). — Trendelenburg, P.: Handbuch exper. Pharmakol. **1**, 544 (1923).

Priv.-Doz. Dr. K. Greeff, Frankfurt/M., Pharmakol. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 493—500 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. F. Brücke)

Über den Einfluß von Eserin, Tetraäthylpyrophosphat (TEPP) und Neostigmin auf den Blutdruck und die pressorischen Carotissinusreflexe der Ratte

Von

O. Hornykiewicz und W. Kobinger

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Januar 1956)

Vor kurzem wurde von Dirnhuber u. Cullumbine (1955) sowie von Varagić (1955) für einige Cholinesterasehemmkörper (Eserin, TEPP, DFP, Sarin u. a.) eine blutdrucksteigernde Wirkung an der Ratte beschrieben, die von den Autoren als zentral bedingt angesehen wird.

Die bei anderen Tierarten häufig beobachtete Blutdrucksenkung nach i.v. Verabreichung von Cholinesterasehemmkörpern wird dagegen allgemein mit der peripheren, muskarinartigen Wirkung dieser Substanzen in Zusammenhang gebracht. Diese uneinheitliche Reaktion des Blutdruckes dürfte darauf zurückzuführen sein, daß je nach Dosierung und Empfindlichkeit der Tiere die zentralen Kreislaufeffekte der Anticholinesterasen häufig durch ihre muskarinartige Gefäßwirkung überdeckt werden.

In nachfolgenden Versuchen soll an Ratten gezeigt werden, daß Anticholinesterasen neben ihrer pressorischen Wirkung auch die Kreislaufreflexe, die durch Entlastung des Carotissinus ausgelöst werden und zu einer allgemeinen Blutdrucksteigerung führen, verstärken. Überdies wurde der Einfluß von Atropin und Reserpin auf die pressorische und reflexsteigernde Wirkung der untersuchten Anticholinesterasen geprüft.

Methodik

Die Versuche wurden an Albinoratten beiderlei Geschlechtes im Gewichte von 180—240 g durchgeführt. Die Tiere waren mit Äthylurethan (1,2 g/kg i. p.) narkotisiert. Beide Carotiden wurden unter Schonung des Vago-Sympathicus freigelegt und der Blutdruck aus der A. carotis sin. mit Hilfe eines Hg-Manometers registriert. Die Auslösung des Carotissinus-Entlastungsreflexes erfolgte durch Abklemmen der A. carotis dextra für die Zeitdauer von 15 sec. Die i. v. Injektionen wurden mittels einer in die V. femoralis dextra eingebundenen Kanüle vorgenommen. Die intracisternalen Injektionen erfolgten, nach Spaltung der Haut in

der Hinterhauptgegend, mit einer dünnen Injektionsnadel, die durch die Nackenmuskulatur und die Membrana atlanto-occipitalis eingestochen und auf diese Weise in die Cisterna cerebello-medullaris eingeführt wurde. Die dabei injizierte Flüssigkeitsmenge betrug stets 0,03 ml. Bei dieser Art der Applikation wurden die Ratten mit einer Atempumpe für Kleintiere künstlich beatmet, um eine Beeinflussung des Blutdruckes durch Veränderungen der Atmung auszuschalten. — Die verwendeten Substanzen wurden in physiologischer Kochsalzlösung, Reserpin nach den Angaben von Tripod u. Meier (1954) unter Zusatz von Ascorbinsäure, gelöst. Die Angaben der Dosen beziehen sich immer auf das Gewicht der freien Verbindungen.

Ergebnisse

1. Wirkung von i.v. Gaben von Eserin, TEPP und Neostigmin auf den Blutdruck und den Carotissinus-Entlastungsreflex

Bei i. v. Injektion von Eserin (60—100 μg/kg) konnten wir regelmäßig eine Blutdrucksteigerung beobachten, wie dies bereits von Dirnhuber u. Cullumbine (1955) und von Varagić (1955) beschrieben wurde.

Abb. 1. Ratte ♀, 190 g. Bei 1: Eserin, 90 μg/kg i.v. Bei 0: CSE. Zeit in allen Abb. in Minuten

Charakteristisch für diesen Eserineffekt ist der verhältnismäßig steile Anstieg, der durchschnittlich 40—90 mm Hg betrug und der langsame bis zu 20 min dauernde Druckabfall auf das Ausgangsniveau. Häufig ging dieser pressorischen Wirkung eine kurzdauernde und mäßige Blutdrucksenkung, die nicht allein durch den Effekt der injizierten Flüssigkeitsmenge erklärbar ist, voraus. Der blutdrucksteigernde Effekt des Eserins konnte am gleichen Tier mehrmals hintereinander mit gleicher Intensität reproduziert werden.

Bei der Auslösung des Carotissinus-Entlastungsreflexes (= CSE) zeigte sich, daß nach Eserin zugleich mit der Blutdrucksteigerung in allen Fällen auch eine eindeutige Verstärkung des Reflexes eintrat (s. Abb. 1). Diese durch Eserin bewirkte Reflexsteigerung war am Höhepunkt der Blutdrucksteigerung am stärksten ausgeprägt und ging im

Verlauf des Blutdruckabfalls ebenfalls auf die vor der Eserininjektion beobachteten Werte zurück. Diese potenzierende Wirkung des Eserins auf den CSE kann jedoch nicht bloß auf die Erhöhung des Blutdruckes zurückgeführt werden, da z. B. Vasopressin in Dosen, die eine Blutdrucksteigerung von etwa gleicher Höhe und ähnlichem Verlauf wie Eserin verursachen, den CSE in keiner Weise verändern.

Durch Exstirpation der Nebennieren wurde der Blutdruck- und reflexsteigernde Effekt des Eserins nicht beeinflußt. Das gleiche Verhalten wie Eserin in bezug auf Blutdruck und den CSE zeigte auch TEPP(500 μg/kg).

Neostigmin hingegen führte in der Dosis von 30—50 μg/kg immer zu einem steilen Blutdruckabfall; die Intensität des CSE blieb dabei unbeeinflußt (Abb. 2).

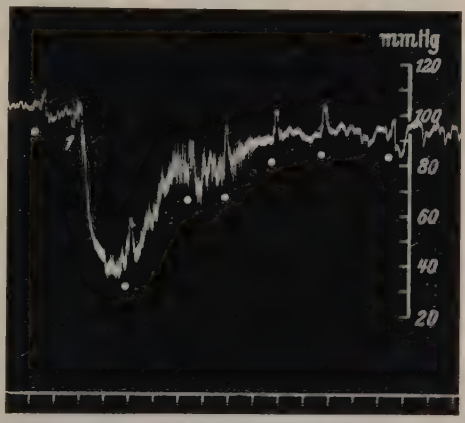


Abb. 2. Ratte ♂, 190 g. Bei 1: Neostigmin, 50 μg/kg. Bei 0: CSE

2. Beeinflussung der Eserinwirkung auf den Blutdruck und den CSE durch Atropin und Reserpin

a) Versuche mit Atropin. Die Untersuchungen von Taverner (1954) haben ergeben, daß Atropin durch einen zentralen Angriffspunkt die Verstärkung der Rückenmarkreflexe durch Eserin aufheben kann.

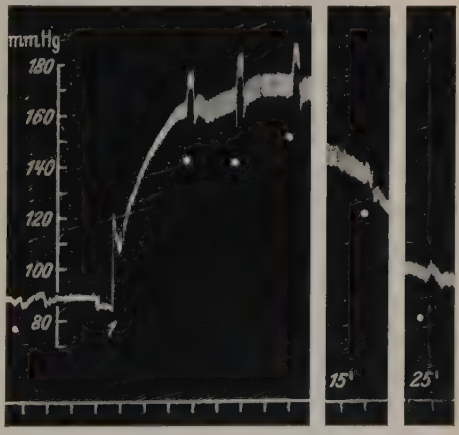


Abb. 3. Ratte ♀, 200 g. Bei 1: Eserin, 2,7 μg/Tier intracisternal. Bei 0: CSE

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß die durch Eserin bewirkte Steigerung des CSE und des Blutdruckes durch Atropin (1,5 mg/kg) ebenfalls gehemmt wird. Dieser Effekt beruht nicht auf der ganglienblockierenden Wirkung des Atropins, da die ganglionär bedingte Blutdrucksteigerung hoher Acetylcholindosen (400 μg/kg) bei der in unseren Versuchen angewendeten Atropindosierung voll

erhalten blieb und erst durch viel höhere Dosen (4 mg/kg) aufgehoben wurde.

Auch Cahen u. Tvede (1953) fanden an Katzen, daß Atropin erst in Dosen von 6—15 mg/kg i.v. die den Blutdruck und die Kreislaufreflexe kontrollierenden Ganglien lähmt.

Dirnhuber u. Cullumbine (1955) haben in ihren Versuchen ebenfalls einen hemmenden Effekt von Atropin auf die Blutdrucksteigerung durch die Anticholinesterase Sarin gesehen, allerdings mit sehr hohen, höchstwahrscheinlich bereits ganglioplegischen Dosen (10 mg/kg).

b) *Versuche mit Reserpin.* Durch die Arbeiten von Bein (1953, 1953a) wurde gezeigt, daß Reserpin, welches keinerlei periphersympathicolytische und ganglienblockierende Wirkungen besitzt, durch seinen zentralen

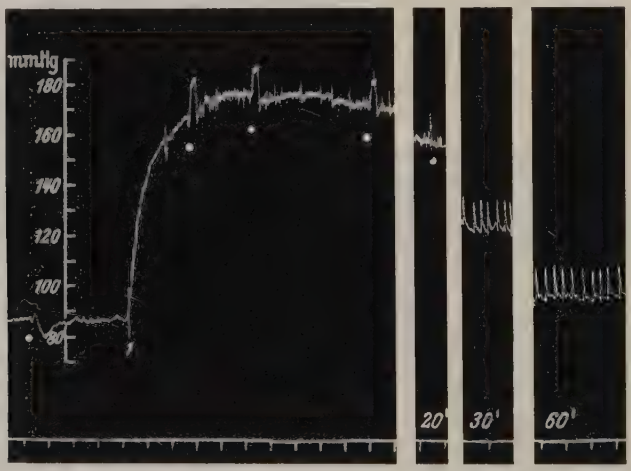


Abb. 4. Ratte ♂ 210 g. Bei 1: Neostigmin, 2 μg/Tier intracisternal. Bei 0: CSE

Angriffspunkt sowohl eine langdauernde Blutdrucksenkung als auch eine Abschwächung pressorischer Kreislaufreflexe hervorruft.

Da die vorangegangenen Versuche mit Atropin einen zentralen Angriffspunkt des Eserins hinsichtlich seiner blutdrucksteigernden und CSE-verstärkenden Wirkung wahrscheinlich machten, war es naheliegend, die Beeinflußbarkeit dieser Eserinwirkung durch Reserpin zu untersuchen.

Reserpin in Dosen von 2,5 mg/kg intraperitoneal führte zu einer mäßigen Blutdrucksenkung und zu einer Abschwächung des CSE, wobei dieser Effekt meist erst nach etwa 30 min voll ausgeprägt war. Eserin, zu diesem Zeitpunkt gegeben, hatte eine viel schwächere Wirkung auf den Blutdruck und den CSE als vor Reserpin. Auffallend war, daß durch höhere Reserpinmengen (bis zu 5 mg/kg) die geprüften Eserinwirkungen zwar noch mehr abgeschwächt wurden, jedoch nicht völlig aufgehoben werden konnten.

3. Wirkung von Eserin und Neostigmin auf den Blutdruck und den CSE bei intracisternaler Injektion

Wenn Eserin den Blutdruck und den CSE tatsächlich durch einen Angriffspunkt an den blutdruckregulierenden Zentren beeinflußt, so sollten durch intracisternale Applikation viel kleinerer Mengen dieser Substanz gleiche Wirkungen auslösbar sein wie bei der i. v. Injektion (vgl. Dirnhuber u. Cullumbine, 1955).

Wie aus der Abb. 3 hervorgeht, führte Eserin in Mengen von 2,7 μg pro Tier intracisternal injiziert zu einer Blutdrucksteigerung, die vergleichbar war mit dem Blutdruckeffekt einer etwa 6fach höheren i. v. Dosierung. Auch hier ging zugleich mit der Blutdruckwirkung eine Steigerung des CSE einher.

Überraschenderweise führte aber auch Neostigmin, 2 μg/Tier intracisternal injiziert, in allen Fällen zu einer Steigerung sowohl des Blutdruckes als auch des CSE (Abb. 4). Dieser Befund scheint insofern bemerkenswert, als Neostigmin bei i.v. Injektion immer einen starken blutdrucksenkenden Effekt hatte.

Wurden die Versuche ohne künstliche Atmung durchgeführt, dann trat einige Minuten nach der intracisternalen Injektion von Neostigmin regelmäßig ein irreversibler Atemstillstand ein, ein Verhalten, das nach Eserin nie beobachtet wurde.

Diskussion

Die Angaben der Literatur über die Wirkung der Anticholinesterasen auf den Blutdruck ergeben ein sehr uneinheitliches Bild.

v. Bezold u. Götz berichteten im Jahre 1867 über eine starke blutdrucksteigernde Wirkung von Eserin am Kaninchen, die ihrer Meinung nach zentral bedingt ist. Ein pressorischer Effekt des Eserin wurde auch von Köhler (1873) und später von Harnack u. Witkowski (1876) sowohl an Hunden als auch an Katzen beobachtet. Diese Befunde wurden auch in neuerer Zeit von zahlreichen Autoren bestätigt (Heathcote 1932; Salerno u. Coon 1949; v. Eickstedt, Erdmann u. Schaefer 1955). Dixon u. Ransom (1924) betonen jedoch in ihrer zusammenfassenden Darstellung, daß Eserin an Katzen häufig auch zu Blutdrucksenkung führt.

Ebenso wie über Eserin wurden auch über die in neuerer Zeit eingeführten Anticholinesterasen wie DFP, TEPP, HETP u. a. sowohl blutdrucksteigernde (Dayrit, Manry u. Seevers 1948; Salerno u. Coon 1949; Paulet 1954; Erdmann u. Schaefer 1954) als auch blutdrucksenkende Effekte (Model, Krop, Hitchcock u. Riker 1946; Heymans u. Jacob 1947; Verbeke u. Votava 1949; Burgen, Keele u. Slome 1949 u. a.) berichtet.

Diese divergierenden Befunde lassen sich zum Teil durch die verschiedenen experimentellen Bedingungen, unter denen sie gewonnen wurden, zum Teil aber sicherlich durch die Verwendung differenter Tierspecies erklären. Je nach der Empfindlichkeit der Tierart tritt nämlich entweder die blutdrucksteigernde Wirkung der Anticholinesterasen, die zentralen Ursprungs sein dürfte, oder aber die peripher durch direkte

Einwirkung auf das cardiovasculäre System bedingte Blutdrucksenkung besonders in Erscheinung (vgl. Dirnhuber u. Cullumbine, 1955).

Die Reaktion des *Rattenblutdruckes* auf Anticholinesterasen scheint in dieser Hinsicht besonders interessant zu sein. An dieser Tierart bewirken Anticholinesterasen, die, wie z. B. Eserin, DFP, TEPP infolge ihrer guten Lipoidlöslichkeit leicht in das Zentralnervensystem eindringen, immer eine Blutdrucksteigerung, während andererseits Stoffe wie Neostigmin und andere (vgl. Varagić, 1955), die als quarternäre Ammoniumbasen gut wasserlöslich sind und deshalb ein viel geringeres Eindringungsvermögen in das Gewebe des Zentralnervensystems besitzten (Dann, 1950; Herken u. Neubert, 1953), meist nur periphere, muskarinartige, zur Blutdrucksenkung führende Effekte haben. Wie aus unseren Versuchen hervorgeht, bedeutet jedoch dieses Vorherrschen der zentralen bzw. peripheren Wirkungen keinen prinzipiellen Unterschied zwischen diesen zwei Gruppen von Anticholinesterasen; denn Neostigmin z. B. macht bei intracisternaler Applikation ebenfalls eine starke Blutdrucksteigerung, was verständlich erscheint, da bei dieser Applikationsart so hohe Konzentrationen am Wirkungsort (= Vasomotorenzentren) erreicht werden, wie sie in Anbetracht der schlechten Lipoidlöslichkeit dieser Substanz bei i.v. Gaben kaum je gegeben sein dürften (vgl. Wirkung des Neostigmins auf das Atemzentrum, Erdmann, Kempe u. Lühning, 1955).

Der Erfolg der intracisternalen Injektion von Eserin und Neostigmin läßt es auch berechtigt erscheinen, für die blutdrucksteigernden Effekte dieser Anticholinesterasen einen vorwiegend zentralen Mechanismus anzunehmen. Für einen solchen Angriffspunkt spechen auch die Versuche mit Reserpin und Atropin; Reserpin, dessen depressorische Wirkung auf die kreislaufregulierenden Zentren festzustehen scheint (Bein, 1953), schwächt den pressorischen Eserineffekt weitgehend ab. Die hemmende Wirkung des Atropins auf die durch Eserin bedingte Blutdrucksteigerung kann ebenfalls durch den auch von zahlreichen anderen Untersuchern gefundenen zentralen Antagonismus zwischen diesem und vielen Anticholinesterasen erklärt werden (Lit. bei Duensing u. Erdmann, 1954).

Ebenso wie die Blutdrucksteigerung scheint auch die beschriebene Verstärkung des CSE durch Anticholinesterasen auf einem zentralen Mechanismus zu beruhen. Dafür spricht vor allem die Tatsache, daß durch intracisternale Injektion sehr kleiner Eserinmengen neben der Blutdrucksteigerung regelmäßig eine Potenzierung des CSE eintritt und daß durch Atropin gleichzeitig mit der Aufhebung der pressorischen auch die CSE-steigernde Wirkung des Eserins aufgehoben wird. Eine direkte Wirkung auf die Pressoreceptoren des Carotissinus ist auf Grund der Ergebnisse der intracisternalen Injektion und der Angaben der Literatur (Landgren, Liljestrand u. Zotterman, 1952; Heymans, Delaunois,

Martini u. Janssen, 1953) unwahrscheinlich. Auch eine direkte Erregung sympathischer Ganglien durch Eserin kann durch den Erfolg der intracisternalen Applikation dieser Substanz ausgeschlossen werden. Daß Eserin auch an anderen Versuchstieren den CSE gelegentlich steigern kann, hat Vercauteren (1932) an Hunden gefunden, ohne jedoch auf den Angriffspunkt dieser Wirkung näher einzugehen.

Neben der Wirkung des Eserin auf die blutdruckregulierenden Zentren, scheint dieses, wie schon Rothberger (1901) und vor kurzem wieder Erdmann, Kempe u. Lühning (1955) gezeigt haben, eine direkte erregende Wirkung auf das Atemzentrum zu besitzen. Darüber hinaus geht aus Untersuchungen über den Einfluß von Anticholinesterasen, im besonderen von Eserin, auf die Reflextätigkeit des Rückenmarkes (Lit. bei Taverner 1954) hervor, daß diese Substanzen viele Reflexe, die über das Rückenmark ablaufen, ebenfalls durch einen zentralen Mechanismus zu potenzieren imstande sind.

Zusammenfassung

1. Die Angaben der Literatur über die pressorische Wirkung von Eserin und TEPP an der Ratte werden bestätigt. Darüber hinaus wird gezeigt, daß die pressorischen Reflexe, welche durch Entlastung des Carotissinus ausgelöst werden, durch Eserin und TEPP ebenfalls aktiviert werden.

2. Auf Grund intracisternaler Applikation des Eserins und Anwendung von Atropin und Reserpin werden die Effekte auf den Blutdruck und den Carotissinus-Entlastungsreflex (= CSE) auf einen zentralen Mechanismus zurückgeführt.

3. Prostigmin, das bei i.v. Gabe nur eine peripher bedingte Blutdrucksenkung macht, hat bei intracisternaler Applikation die gleichen Wirkungen auf den Blutdruck und den CSE wie Eserin und TEPP.

Literatur

Bein, H. J.: Experientia (Basel) **9**, 107 (1953). — Bein, H. J., F. Gross, J. Tripod u. R. Meier: Schweiz. med. Wschr. **1953** a, 1007. — v. Bezold, A., u. E. Götz: Zbl. med. Wissenschaften, Jg. **5**, 241 (1867). — Burgen, A. S. V., C. A. Keele and D. Slome: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **96**, 396 (1949). — Cahen, R. L., et K. M. Tvede: Arch. internat. Pharmacodynamie **94**, 248 (1953). — Dann, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **212**, 158, (1950). — Dayrit, C., C. H. Manry and M. H. Seevers: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **92**, 173 (1948). — Dirnhuber, P., and H. Cullumbine: Brit. J. Pharmacol. **10**, 12, (1955). — Dixon, W. R., u. F. Ransom: Handbuch d. exper. Pharmakologie **2**/II, 786 (1924). — Duensing, F., u. W.-D. Erdmann: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 506 (1954). — v. Eickstedt, K.-W., W.-D. Erdmann u. K.-P. Schaefer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 435 (1955). — Erdmann, W.-D., u. K. P. Schaefer: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **223**, 519 (1954). — Erdmann, W.-D., H.-D. Kempe u. W. Lühning: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 359 (1955). — Harnack, E., u. L. Witkowski: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **5**, 401 (1876). — Heathcote, R. St. A.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **44**, 95 (1932). — Herken, H., u. D. Neubert: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 223 (1953). — Heymans, C.,

et J. Jacob: Arch. internat. Pharmacodynamie **74**, 233 (1947). — Heymans, C., A. L. Delaunois, L. Martini et P. Janssen: Arch. internat. Pharmacodynamie **96**, 209 (1953). — Köhler, H.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **1**, 277 (1873). — Landgren, S., G. Liljestrand, and Y. Zotterman: Acta physiol. scand. (Stockh.) **26**, 264 (1952). — Modell, W., S. Krop, P. Hitchcock and W. F. Riker: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **87**, 400 (1946). — Paulet, G.: Arch. internat. Pharmacodynamie **97**, 157 (1954). — Rothberger, J. C.: Pflügers Arch. **87**, 117 (1901). — Salerno, P. R., and J. M. Coon: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **95**, 240 (1949). — Taverner, D.: Brit. J. Pharmacol. **9**, 84 (1954). — Tripod, J., et R. Meier: Arch. internat. Pharmacydonamie **97**, 251 (1954). — Varagić, V.: Brit. J. Pharmacol. **10**, 349 (1955). — Verbeke, R., et Z. Votava: Arch. internat. Pharmacodynamie **79**, 367 (1949). — Vercauteren, Et.: Arch. internat. Pharmacodynamie **42**, 339 (1932).

Dr. O. Hornykiewicz, Dr. W. Kobinger, Pharmakol. Inst. der Universität Wien IX (Österreich), Währingerstr. 13a

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 501—512 (1956)

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Greifswald
(Direktor: Prof. Dr. med. Holle)

Über Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration in der Meerschweinchenniere nach Arterienligatur

Von
G. Holle und Chr. Müller

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Januar 1956)

Berichte über histologische oder biochemische Nierenveränderungen nach lokalen oder allgemeinen Schädigungen der verschiedensten Art finden sich sowohl im älteren (Litten, Brodersen) als auch im neusten Schrifttum (Kettler, Holle und Mitarbeiter). Sie haben entweder das Ziel, die Art des Gewebesschadens bei der Entstehung des anämischen Infarktes aufzuklären (Litten, Borger) oder sie bemühen sich um die gestaltliche Abgrenzung anabiotischer von katabiotischen oder kadaverösen Veränderungen (Fahr, Groll und Mitarbeiter). Einige Untersucher schließlich sind der Frage nachgegangen, wie sich die Nekrose nach Einwirkung bekannter und experimentell reproduzierbarer Schädigungen (Arterienligatur) zeitlich entwickelt und wie der Schädigungsmechanismus zu denken ist (Moegen, Kettler, Holle und Mitarbeiter).

Aus den Arbeiten der Groll'schen Schule geht hervor, daß das Bild der acidophilen Koagulationsnekrose unter Mitwirkung von Calcium durch Aktivierung gerinnungsfördernder Zellfermente entsteht (Bauer). Auch die einfache intravitale Karyo- und Zytolyse ist wahrscheinlich ein enzymatischer Vorgang (Letterer). Damit war klargestellt, daß das histologische Bild der Nekrose als Ergebnis komplizierter vitaler Reaktionen aufzufassen ist (V. Becker). Über die Herkunft und den Aktivierungsmechanismus der beteiligten Fermente herrscht jedoch noch große Unsicherheit. Zweifellos handelt es sich bei der Autolyse großenteils um die gleichen biologischen Katalysatoren, welche unter physiologischen Bedingungen den Stoffwechsel der Zelle regulieren. Sie erleiden während des Absterbens durch Wegfall von Steuerungsmechanismen und Abbau ihrer wasserunlöslichen Trägerstoffe Veränderungen, die offenbar ein Überwiegen abbauender, proteolytischer Leistungen über solche synthetischer Art zur Folge haben (Grassmann und Müller). Für einzelne von ihnen, wie das im Sauren wirksame Kathepsin, ist allerdings eine physiologische Funktion bisher nocht nicht bekannt. Andere

Fermente sollen aus dem Blute stammen und im Verlauf von Zirkulationsstörungen mit dem Serum oder Plasma die Gefäße verlassen, also von außen an die Zelle herangebracht werden (Heterolyse: Borger, Terbrüggen, Bauer, Cain). Für das Inkrafttreten des einen oder anderen Mechanismus wird der Wasserstoffionenkonzentration insofern eine entscheidende Rolle beigemessen, als „Autolyse" im Sauren, „Heterolyse" im alkalischen Milieu ablaufen soll (Bauer). Die Wasserstoffionenkonzentration wäre demnach ein Kriterium für die fermentative Eigenart der Zytolyse.

Die Annahme einer „Heterolyse" stützt sich u. a. auf ältere Untersuchungen Borgers am Infarkt, die eine zunehmende Alkalisierung vom benachbarten Gewebe her ergeben hatten, sowie die „Modellversuche zur Coagulationsnekrose" von Bauer und die Implantationsexperimente Cains, ist jedoch in neuerer Zeit nicht unwidersprochen geblieben. Festzustehen scheint, daß abgestorbenes Gewebe im Organismus infolge plasmatischer oder seröser Durchtränkung von der Umgebung her alkalisiert wird. Dagegen ist der Fermentgehalt derartiger Ergüsse noch unbewiesen. Möglicherweise beschränkt sich ihre Wirkung auf eine p_H-Änderung nach der alkalischen Seite, zumal autolytische, zelleigene Fermente bekannt sind, deren Reaktionsoptimum im Alkalischen liegt (Polynucleotidasen, Amidasen, Tryptasen, Letterer, Grassmann u. Müller). Es ist also bisher nicht bewiesen, daß sich Alkalisierung und Autolyse gegenseitig ausschließen, und die Zusammenhänge zwischen Wasserstoffionenkonzentration und fermentativer Gewebsauflösung lassen sich offenbar nicht auf einen so einfachen Nenner bringen, wie das Bauer geglaubt hat.

Diese allgemeine Unsicherheit und die Tatsache, daß den meisten älteren Untersuchungen methodische Unzulänglichkeiten anhaften, lassen es zweckmäßig erscheinen, weitere Grundlagen zu erarbeiten. Besonders geeignet hierzu sind p_H-Bestimmungen mit der Glaselektrode am lebenden Versuchstier, wie sie in jüngster Zeit Frunder zur Untersuchung von Entzündungsprozessen erfolgreich benützt hat. Aber auch diese Methode ist prinzipiellen Einschränkungen unterworfen und ihre Ergebnisse sind weniger revolutionierend, als man ursprünglich annahm.

Zunächst hat sich gezeigt, daß Wasserstoffionenkonzentration und Funktion eines bestimmten Gewebsbezirkes eng aufeinander bezogen sind. Ändert sich der p_H-Wert, so kommt es zu Funktionsstörungen. Umgekehrt können auch diese die Wasserstoffionenkonzentration abändern. Wenn sich z. B. im entzündeten Gewebe gegenüber dem normalen eine Säuerung findet, so ist es zunächst fraglich, ob sie die Ursache der Entzündung ist oder deren Folge. Der p_H sinkt bei den verschiedensten Eingriffen ab (Frunder), gleichgültig ob diese mechanischer oder chemischer Natur sind, und derartige „physiologische Acidosen" begleiten die meisten Lebensvorgänge im Gewebe. Das beruht auf einer gewissen Reaktionsarmut der Zelle, die die verschiedenartigsten Reize immer in der gleichen Weise beantwortet. Man muß sich deshalb hüten, p_H-Änderungen immer auf eine bestimmte, wohldefinierte Stoffwechselstörung zu beziehen, da saure Valenzen auf ganz verschiedenen Wegen entstehen können. Insbesondere ist es möglich, daß unter krankhaften Reaktionsabläufen Stoffwechselprozesse ins Spiel treten, die der intakten Zelle fehlen und deshalb schwer zu beurteilen sind.

Sind also die Ergebnisse derartiger p_H-Messungen auf der einen Seite vieldeutig, so vermitteln sie auf der anderen nur einen verhältnismäßig groben Eindruck vom Chemismus der Zelle. Dieser dürfte selbst innerhalb eines zelligen Gebildes sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen wechseln, da die verschiedenen Reaktionsorte nicht den gleichen p_H-Wert besitzen (Netter und Leuthardt). Auch das bindegewebige Stroma und die Intercellularflüssigkeit sind mit ihren Reaktionen an der gemessenen „Quersumme" (Letterer) beteiligt. Man muß sich also stets vor Augen halten, daß selbst so diffizile Methoden wie die p_H-Bestimmung mit der Glaselektrode lediglich Summationswerte ergeben, die nicht allzu viel über den aktuellen p_H in den beteiligten Zellen oder gar in den einzelnen Zellbestandteilen aussagen. Die Ergebnisse derartiger Messungen gestatten deshalb bei Berücksichtigung dieser methodischen Schwierigkeiten immer nur sehr vorsichtige Schlüsse auf bestimmte biochemische Zusammenhänge (Netter u. Leuthardt).

Die nachfolgenden Messungen wurden durch Befunde angeregt, die bei kombinierten histologischen, histochemischen und manometrischen Untersuchungen der Meerschweinchenniere nach Arterienligatur verschiedener Zeitdauer erhoben wurden. Obwohl dabei die Atemintensität der Nierenrinde schnell und schon in den ersten Stunden auf 50% der Ausgangswerte absinkt, treten die ersten morphologischen Merkmale einer Zellschädigung frühestens nach etwa 4 Std auf .Wir hatten das Vorhandensein eines solchen „freien Intervalles", über das auch andere Autoren berichten (Moegen, Büchner u. Lucadou), mit Ausgleichsmechanismen in Zusammenhang gebracht, welche die Zelle möglicherweise befähigen, einen vorübergehenden Sauerstoffmangel zu kompensieren. In diesem Zusammenhang schien uns die Frage bedeutsam, welchen Anteil p_H-Änderungen am Ablauf einer ischämischen Hypoxydose besitzen. Kennt man ferner den p_H, unter dessen Einfluß die Katabiose abläuft, so können wir auf die Fermente schließen, welche bei der jeweils vorliegenden Form des Gewebstodes die Zellen zur Auflösung bringen.

Methodik

Den folgenden Ergebnissen liegen Untersuchungen an 41 Meerschweinchen zugrunde. Die Tiere wurden zur Ruhigstellung in Narkose eingegipst. Nach Anlegung eines Fensters auf dem Rücken wurde jeweils die linke Niere von dorsal freigelegt. Zur p_H-Messung diente zunächst eine niederohmige Glasnadelelektrode (nach Voegtlin, Kahler u. Fitch), die etwa 10 mm in die Niere eingeführt wurde. Zur Vermeidung von CO_2- und Feuchtigkeitsverlusten wurde das Operationsgebiet mit weichem Paraffin, Clauden und feuchten Tupfern abgedeckt. Die Tiere standen 1 Std im Versuch. Alle 5 min wurde der p_H-Wert abgelesen. Nach Beendigung der Messungen wurde die Niere entfernt und der Stichkanal histologisch untersucht. Die Elektrode wurde für jeden Versuch nachgeeicht. Während des gesamten Eingriffes sorgte künstliche Wärmezufuhr mit Hilfe einer Rotlichtlampe für konstante Körpertemperatur. Nach entsprechenden Vorversuchen wählten wir folgende Versuchsanordnungen:

1. Gruppe: 6 Tiere. Die Nierengefäße wurden nicht unterbunden und der p_H im freigelegten Organ 1 Std lang verfolgt.

2. Gruppe: 15 Tiere. Vor Beginn der Messungen wurde nach Freilegung des Organs eine Schlinge um den Gefäßpol gelegt und 15 min nach Beginn der Ablesungen zugezogen. Weitere Verfolgung des p_H in Abständen von 5 min über 1 Std.

3. Gruppe: 7 Tiere. Die Arterie wird vor Einführung der Elektrode in die Niere unterbunden. Dauer der Messung 1 Std in Abständen von 5 min.

Zur Kontrolle der auf diesem Wege gewonnenen Werte und zur Vermeidung des bei Anwendung von Nadelelektroden unumgänglichen Stichkanals nahmen wir weitere Messungen mit der Aufsatzelektrode nach McInnes und Dole (in der Modifikation nach Frunder) vor. In einer

4. Gruppe von 3 Tieren wurde eine sehr dünne Schicht der Nierenoberfläche abgetragen und die Membran der Elektrode fest auf die so entstandene Wundfläche aufgesetzt. Die Zwischenlagerung von Blutgerinnseln läßt sich dabei durch entsprechende Sorgfalt vermeiden.

Um Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration in der ligierten Niere über *längere* Zeit verfolgen zu können, erwies sich eine weitere Modifikation dieser Versuche als notwendig. In einer

5. Gruppe wurde bei 10 Tieren die Nierenarterie unterbunden und die Operationswunde hierauf verschlossen. Bei je einer Niere wurde dann nach 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15 und 18 Std die Niere wieder freigelegt und eine p_H-Messung mit der Aufsatzelektrode vorgenommen. Nach Abschluß der Messung auch hier Exstirpation und histologische Kontrolle der Organe. Eine fortlaufende Kontrolle des p_H an einem Tier über mehrere Stunden gelang nicht, da nach etwa 2 Std Kreislaufunregelmäßigkeiten einsetzen, so daß die Messungsergebnisse ungenau werden. Ein großer Teil der Tiere ging dabei zugrunde.

Untersuchungsergebnisse

I. Ergebnisse der p_H-Messungen

1. Gruppe: p_H-Messungen an der freigelegten, nicht ligierten Niere. Die folgende Tabelle gibt Mittelwerte von jeweils 6 Tieren wieder.

Tabelle 1

p_H bei Beginn der Messung	6,29—0,20	p_H nach 35 min	6,50—0,17
p_H nach 5 min	6,28—0,27	p_H „ 40 „	6,51—0,17
p_H „ 10 „	6,38—0,22	p_H „ 45 „	6,52—0,15
p_H „ 15 „	6,47—0,22	p_H „ 50 „	6,50—0,04
p_H „ 20 „	6,47—0,14	p_H „ 55 „	6,52—0,04
p_H „ 25 „	6,41—0,17	p_H „ 60 „	6,55—0,04
p_H „ 30 „	6,44—0,14	p_H „ 65 „	6,55—0,14

Die anfängliche leichte Acidose ist als Folge des Einstiches zu werten. Nach etwa 15 min ist sie wieder abgeklungen. Von da an bis zum Ende des Versuches ändert sich der p_H nur noch unwesentlich. Die mittlere Streuung ist weniger das Ergebnis eines unterschiedlichen Verhaltens der Tiere als eines verschieden hohen Anfangs-p_H.

2. Gruppe. In dieser Gruppe von Tieren erfolgten die p_H-Messungen vor und nach Ligatur des gesamten Gefäßstieles. Um die anfängliche Acidose abklingen zu lassen, wurden zunächst 4 Ablesungen am normalen,

nicht unterbundenen Organ vorgenommen. Dann erfolgte das Zuziehen der Schlinge bei liegender Elektrode. Die Ergebnisse dieser Messungen gehen aus Tab. 2 hervor.

Tabelle 2

p_H bei Beginn der Messung	6,67—0,32	p_H nach 35 min	6,32—0,32
p_H nach 5 min	6,69—0,31	p_H „ 40 „	6,26—0,33
p_H „ 10 „	6,72—0,24	p_H „ 45 „	6,21—0,31
p_H „ 15 „	6,77—0,27	p_H „ 50 „	6,19—0,31
Ligatur		p_H „ 55 „	6,18—0,30
p_H nach 15 min	6,69—0,24	p_H „ 60 „	6,16—0,30
p_H „ 20 „	6,60—0,27	p_H „ 65 „	6,15—0,30
p_H „ 25 „	6,47—0,31	p_H „ 70 „	6,18—0,24
p_H „ 30 „	6,38—0,32		

Aus der Tabelle geht hervor, daß der p_H-Abfall zunächst schnell, später langsamer erfolgt. Von der 50. Minute an stabilisieren sich die Werte und die Wasserstoffionenkonzentration bleibt nahezu gleich. Auch hier beruht die Streuung der aus 15 Tieren berechneten Mittelwerte auf Unterschieden im Anfangs-p_H der einzelnen Tiere. Der Kurvenverlauf ist bei sämtlichen Tieren ziemlich übereinstimmend, so daß die in der Tabelle wiedergegebenen Werte als recht gut gesichert angesehen werden können.

3. Gruppe. Hier erfolgte vor Beginn der Messungen eine Arterienligatur. p_H-Messungen der freigelegten, aber nicht ligierten Niere wurden hier nicht vorgenommen. Die Ergebnisse der Versuche sind in der folgenden Tab. 3 zusammengestellt.

Tabelle 3

p_H bei Beginn der Messung	6,74—0,17	p_H nach 35 min	6,14—0,32
p_H nach 5 min	6,52—0,30	p_H „ 40 „	6,13—0,32
p_H „ 10 „	6,41—0,30	p_H „ 45 „	6,01—0,23
p_H „ 15 „	6,34—0,35	p_H „ 50 „	6,01—0,24
p_H „ 20 „	6,30—0,31	p_H „ 55 „	6,03—0,26
p_H „ 25 „	6,25—0,34	p_H „ 60 „	5,99—0,22
p_H „ 30 „	6,19—0,35		

Auch hier erfolgt nach Anlegung der Ligatur ein schneller Abfall der p_H-Werte, der sogar steiler ist, als nach Unterbindung des gesamten Gefäßstieles. Die Wasserstoffionenkonzentration nimmt anfangs schnell, später langsamer zu. Gegen Ende des Versuches bleiben auch hier die Werte nahezu konstant. Man muß daraus den Schluß ziehen, daß die durch Gefäßligatur ausgelöste p_H-Abnahme bereits am Ende der ersten Stunde zu einem gewissen Stillstand kommt. Wir werden auf diese Tatsache zurückkommen müssen. Der Kurvenverlauf ist bei sämtlichen im Versuch stehenden Tieren ziemlich gleichförmig.

4. Gruppe. Zur Kontrolle der mit der Nadelelektrode gewonnenen Werte erfolgten die Messungen hier mit einer Aufsatzelektrode (nach

McInnes und Dole) nach Abtragung der Nierenkapsel und einer oberflächlichen Rindenschicht. Das Ergebnis dieser Messungen geht aus der Tab. 4 hervor.

Tabelle 4

p_H bei Beginn der Messung	6,93	p_H nach 35 min	6,27
p_H nach 5 min	6,86	p_H „ 40 „	6,23
p_H „ 10 „	6,63	p_H „ 45 „	6,08
p_H „ 15 „	6,52	p_H „ 50 „	6,00
p_H „ 20 „	6,44	p_H „ 55 „	6,04
p_H „ 25 „	6,37	p_H „ 60 „	6,04
p_H „ 30 „	6,36		

Da schon wenige orientierende Versuche Übereinstimmung der Ergebnisse mit beiden Elektroden ergaben, haben wir in dieser Gruppe auf Messungen an einer größeren Zahl von Tieren verzichtet. Die Endwerte entsprechen fast vollkommen denen der Gruppe 3.

Die *5. Gruppe* umfaßt p_H-Messungen nach Arterienligatur längerer Zeitdauer. Derartige Messungen erwiesen sich als notwendig, da die bisherigen Untersuchungen ein Konstantbleiben der Werte nach 1Std ergeben hatten. Die Ergebnisse dieser Gruppe müssen als vorläufig bezeichnet werden, da wir aus äußeren Gründen für jede Zeitstufe nur ein Tier zur Verfügung hatten. Die Ergebnisse gehen aus Tab. 5 hervor.

Tabelle 5

p_H nach 2stündiger Ligatur	6,05	p_H nach 8stündiger Ligatur	6,17
p_H „ 3 „ „	5,98	p_H „ 10 „ „	6,10
p_H „ 4 „ „	6,11	p_H „ 12 „ „	6,09
p_H „ 5 „ „	5,90	p_H „ 15 „ „	6,35
p_H „ 6 „ „	5,97	p_H „ 18 „ „	6,20

Aus den vorstehenden Werten, ergeben sich zunächst beträchtliche Schwankungen der Messungsergebnisse. Das ist zweifellos eine Folge der zu geringen Zahl von Einzelmessungen. Wie weit sich hinter diesen Unregelmäßigkeiten echte p_H-Verschiebungen, etwa eine Neigung zur Normalisierung der Acidose verbergen, läßt sich nur durch Messungen an einer sehr viel größeren Zahl von Tieren feststellen. Aber bereits aus den hier vorliegenden Werten muß man folgern, daß eine weitere wesentliche Verschiebung des p_H nach der sauren Seite jenseits der 1. Unterbindungsstunde nicht mehr erfolgt. Damit erfährt das Ergebnis unserer ersten Versuchsreihen eine gewisse Bestätigung. Aber auch die scheinbare leichte Neigung zur Erholung der p_H-Werte ist nicht signifikant.

II. Ergebnis der histologischen Untersuchung

Die histologische Untersuchung des Stichkanals nach einstündiger Messung mit der Nadelelektrode ergibt zunächst die Tatsache einer unmittelbaren Berührung des Elektrodenglases mit dem Gewebe der

Nierenrinde. In unmittelbarer Nachbarschaft des Einstichkanals, der in der Regel völlig frei von Blutgerinnseln ist, in einer Breite, die dem Durchmesser dreier Glomerula entspricht, finden sich deutliche nekrobiotische Veränderungen an den Tubulusepithelien (Abb. 1 u. 2). Das Cytoplasma zeigt eine feintropfige Entmischung, die Zellkerne sind pyknotisch oder in Auflösung begriffen. Demgegenüber erweisen sich die tieferen Teile des Nephrons, insbesondere die Schaltstücke, als nahezu unverändert. Die Glomerula sind in der erwähnten Zone geschrumpft und vielfach deformiert. Insgesamt sind die geweblichen Veränderungen auffallend gering, was zweifellos auf der kurzen Dauer der Messungen beruht. Stärkere Blutungen oder hämorrhagische Infarkte sahen wir nicht. Diejenigen Nieren, deren p_H mit der Aufsatzelektrode gemessen wurde, ergaben den gleichen Befund. Unterhalb der Schnittfläche, auf der die Elektrode stand, fanden wir dem Ausmaß und der Eigenart nach die gleichen Veränderungen an den Glomerulis und am tubulären Apparat wie längs der Stichkanäle. In nur geringer Entfernung von der Wundfläche erwies sich das Parenchym bei Anwendung der üblichen Färbemethoden als völlig normal. Die histologische Kontrolle der längere Zeit unterbundenen Nieren ergab die gleichen Befunde, wie sie von Holle u. Mitarb. nach langdauernder Arterienunterbindung beschrieben wurden. Auch hier führte der Vorgang der p_H-Messung zu keinen gröberen Gewebszerstörungen.

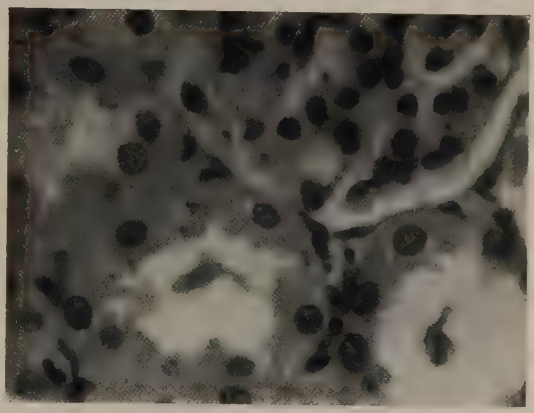


Abb. 1. Glomerulum und Tubulus in normaler Niere. Meerschweinchen

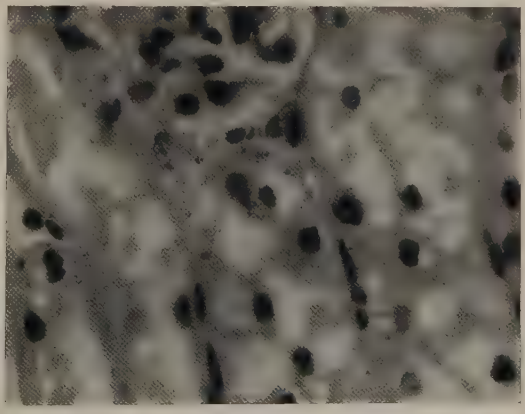


Abb. 2. Glomerulum und Tubulus in der Nachbarschaft eines Elektrodenstichkanals

Diese Feststellungen sind deshalb bedeutungsvoll, weil sie gewisse Rückschlüsse auf die Beeinflussung unserer Messungsergebnisse durch mechanische Läsionen des Gewebes gestatten. Da sich p_H-Differenzen im zwischenzelligen Raum schnell ausgleichen, muß man annehmen, daß unsere Werte einem Durchschnitt entsprechen, der sich durch Ausgleich der Schädigungsacidose am Ort des Einstiches (Frunder) mit dem p_H des elektrodenfernen Nierenparenchyms ergibt. Da die mechanische Läsion im Falle unserer Experimente sich lediglich auf eine schmale Zone erstreckt, möchten wir diesen Fehler als gering veranschlagen.

Diskussion

Ein Vergleich der eigenen Untersuchungsergebnisse mit denen anderer Autoren stößt insofern auf Schwierigkeiten, als die gewählten Methoden und Versuchsbedingungen stark voneinander abweichen. Eine Anzahl von Experimenten zur Frage des örtlichen Gewebstodes wurde an Implantaten vorgenommen (Cain, Guillery). Messungen der Wasserstoffionenkonzentration erfolgten in der Regel an Gewebsbrei und -extrakten (Bayerle u. Borger, Bauer) oder an Organen, die dem bereits getötetem Tier entnommen waren und sagen dementsprechend wenig über die Verhältnisse im lebenden Organismus und bei intaktem Kreislauf oder bei Kreislaufbehinderung aus. Auch haben ältere Untersucher grobe Fehlerquellen wie CO_2-Verlust und unkontrollierbare fermentative Umsetzungen in dem zertrümmerten Gewebe nicht mit der notwendigen Sorgfalt ausgeschlossen. Hinzu kommt, daß die benützten Elektroden (Wasserstoff- und Chinhydronelektroden) für das Gewebe nicht indifferent sind und daher die Messungsergebnisse in verschiedener Richtung beeinflussen können (Netter u. Leuthardt, Frunder).

Auch der zur Erzeugung von Nekrosen begangene Weg und die Wahl des Versuchstieres können die Untersuchungsergebnisse unvergleichbar gestalten. So führt beispielsweise die Unterbindung der Art. renalis bei Kaninchen und Hund zur Ausbildung typischer anämischer Infarkte, also umfangreicher Totalnekrosen (Litten, Brodersen, Boger, Peters und Kurz, Kettler u. a.), während der gleiche Eingriff beim Meerschweinchen lediglich einen mehr oder weniger schnellen Untergang der Hauptstückepithelien zur Folge hat. Das beruht auf der besseren Vascularisierung der Meerschweinchenniere durch Nebenzuflüsse, die bei der Ligatur des Hauptstammes nicht gefaßt werden und eine Restzirkulation garantieren. Die Nekrose bleibt deshalb unvollständig und auf die besonders empfindlichen Hauptstückepithelien beschränkt (Holle u. Mitarb.). Bestimmungen der Wasserstoffionenkonzentration nach Arterienligatur müssen deshalb beim Meerschweinchen andere Resultate ergeben als beim Kaninchen. So ist es nicht verwunderlich, daß Borger nach Arterienligatur bei dem letztgenannten Tier einen p_H-Anstieg, also Alkalisierung nachgewiesen hat, da sich diese Messungen auf das Innere von Infarkten, also von Totalnekrosen beziehen, wie sie bei unseren Versuchstieren nicht vorkommen. Ergebnisse bei einer Tierart lassen sich also nicht ohne weiteres auf eine andere übertragen. Jeder Versuch einer derartigen Verallgemeinerung birgt jedenfalls die Gefahr schwerwiegender Irrtümer in sich.

Außer diesen allgemeinen methodischen Schwierigkeiten unterliegt die Deutung von Ergebnissen der p_H-Messung im Gewebe einer Reihe prinzipieller Einschränkungen. Da die Zelle unter orthologischen Bedingungen ihre eigene „aktuelle Reaktion" gegenüber der Interzellularflüssigkeit festhält, gestatten Messungen mit grob in das Gewebe eingeführten Elektroden nur äußerst vorsichtige Rückschlüsse auf p_H-Änderungen im Zellinneren. Man kann allerdings damit rechnen, daß Schädigungen der verschiedensten Art Membranstörungen und damit Ionenwanderungen zur Folge haben (Rothschuh), so daß es zu einem gewissen Ausgleich zwischen Zellinnerem und Interzellularflüssigkeit kommt. Aber auch in diesem Falle werden zunächst lediglich die Zustände in der flüssigen Phase des Protoplasmas erfaßt (Netter u. Leuthardt), da sich die strukturgebundenen Ionen der Messung entziehen. Infolge dieser asymmetrischen Donnan-Verteilung können innerhalb der Zelle erhebliche p_H-Differenzen auftreten (Schmidtmann, Spek), die neuerdings auf bis zu zwei p_H-Einheiten veranschlagt werden (Netter u. Leuthardt). Während des Absterbens der Zelle und im Verlauf des damit verbundenen Strukturzerfalles dürften sich diese Differenzen allerdings mehr und mehr ausgleichen, da sich das anfangs mikroheterogene System des Protoplasmas durch autolytische Vorgänge mehr und mehr homogenisiert. Messungen der Wasserstoffionenkonzentration am absterbenden Gewebe können also um so größeren Anspruch auf Genauigkeit erheben, je weiter die Nekrose fortgeschritten ist.

Die eigenen Untersuchungen ergaben an der Meerschweinchenniere nach Gefäß- bzw. Arterienligatur ein Absinken des p_H von Anfangswerten zwischen 6,69 und 6,93 auf 5,99 innerhalb einer Stunde, also eine deutliche Verschiebung nach der sauren Seite. Dabei strebt die sich hieraus ergebende Kurve allmählich der Horizontalen zu, da nach 60 min ein p_H-Wert von etwa 6,0 erreicht wird, der sich nicht mehr wesentlich ändert. Wie weit es auf höheren Zeitstufen jenseits der 10. Stunde zu einem erneuten geringen Ansteigen in Richtung auf normale Werte kommt, läßt sich auf Grund unserer jetzt vorliegenden Ergebnisse noch nicht mit Sicherheit entscheiden.

Einen ähnlichen, jedoch schon innerhalb von 2 min erfolgenden p_H-Sturz fand Thorn bei 90 sec dauernder Drosselung der Blutzufuhr zum Gehirn. Nach Wiederherstellung der Zirkulation stieg der p_H allerdings schnell wieder auf die ursprüngliche Höhe an. Die Acidose war also nach Beseitigung der auslösenden Ursache reversibel, eine Tatsache, zu der wir auf Grund der eigenen Versuchsanordnung (Dauerligatur!) nicht Stellung nehmen können. Auch Frunder hat reversible p_H-Verschiebungen nach der sauren Seite erzielt. Er fand sie bei ganz verschiedenen Reizen (mechanischen, chemischen, Sauerstoffmangel, CO-, KCN-Vergiftung) und konnte sie am lebenden Tier mit der Glaselektrode fortlaufend messen. Der Wirkungsmechanismus ist offenbar ganz unspezifisch und beruht auf der vorübergehenden Ausbildung eines Mißverhältnisses zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot, das sowohl durch verminderte O_2-Zufuhr als auch erhöhten Verbrauch

entstehen kann und bei zahlreichen physiologischen Prozessen eine Rolle spielt (sog. „physiologische Acidose", Frunder).

Wie seit den Untersuchungen Warburgs bekannt ist, setzen bei verminderter Verbrennung anaerobe Spaltungsprozesse ein, die das entstandene Energiedefizit bis zu einem gewissen Grade decken und durch Glykolyse unterhalten werden. „Der Reiz- und Erregungsstoffwechsel" ist also „kein reiner Oxydationsstoffwechsel mehr, sondern eine Mischung von Oxydations und Spaltungsstoffwechsel" (Frunder).

Besitzen die angewandten Reize allerdings Schädigungscharakter und stellt sich, wie in den eigenen Experimenten, die Blutzirkulation nicht wieder vollständig her, so können sich irreversible Störungen des Oxydationssystems entwickeln. Das Gewebe wäre in einem solchen Falle zur Deckung seines Energiebedarfs ausschließlich auf die direkte Glykolyse angewiesen. Dabei dürfte es alle Übergänge zwischen geringer Störung und teilweiser oder vollständiger Aufhebung der Oxydation und einem jeweils verschiedenen Anteil der anaeroben Spaltung geben, was sich naturgemäß auf Schnelligkeit und Eigenart des geweblichen Absterbevorganges auswirken muß.

Auch die von uns in der Meerschweinchenniere nach Arterienunterbindung einsetzende Acidose ist als „Schädigungsacidose" (Frunder) aufzufassen und auf eine Anhäufung „fixer Säuren", d. h. von Zwischenprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels (Brenztraubensäure u. a.) zu beziehen. Weiterhin dürfte der ischämisch bedingte Zerfall energiereicher Phosphorverbindungen an der Säuerung mitwirken, zumal diese offenbar besonders empfindlich gegen Sauerstoffmangel sind und sich schon nach wenigen Minuten im Gewebe vermindern (Schumann, Colldahl, Frunder, Holle u. Burkhardt). Sauere Proteinspaltungsprodukte spielen demgegenüber keine Rolle, da die Zelle innerhalb des von uns gewählten Unterbindungsintervalles morphologisch noch völlig intakt ist.

Eine Interpretation der eigenen Messungen muß weiterhin von der Tatsache ausgehen, daß die sich nach Arterienunterbindung in der Meerschweinchenniere entwickelnde Zirkulationsstörung weder zu kompletter Ischämie bzw. Anämie des Organs noch zu vollständiger Erholung führt. Es kommt vielmehr zu einer in mehreren Phasen ablaufenden Zirkulationsstörung, die mit Ödem und Hyperämie des gesamten Organs beginnt und nach etwa 60 min durch das Ingangkommen eines Ersatzkreislaufes von der Kapsel und vom Nierenbecken her allmählich wieder abklingt.

Weitere interessante Einblicke in den Mechanismus der ischämischen Hypoxydose ergeben sich aus der vergleichsweisen Einbeziehung manometrischer, histochemischer und phasenoptischer Befunde, die Holle u. Mitarb. bei gleicher Versuchsanordnung und am gleichen Objekt erhoben haben. Sie gehen von der Beobachtung aus, daß die Gesamtatmung von Gewebsschnitten aus der Nierenrinde nach Arterienligatur im Warburg-Manometer nach Art einer Halbwertzeitkurve in 4,6 Std bis auf 50% der Ausgangswerte abfällt. Gleichzeitige phasenoptische und histochemische Untersuchungen ergaben hinsichtlich der *morphologischen Erkennbarkeit* des sich entwickelnden Gewebsschadens insofern ein freies Intervall,

als die ersten sichtbaren Veränderungen frühestens nach 4 Std, also nach Verminderung der Atemintensität um 50% zu beobachten waren. Als Ursache für ein derartiges verspätetes Sichtbarwerden von Nekrose (Nekrophanerose, Büchner) sind vielfach methodische Schwierigkeiten in der Erkennbarkeit feinster Abwandlungen der Protoplasmastruktur angegeben worden. Außerdem liegt es nahe, an das Vorhandensein von Ausgleichsvorgängen in der Zelle zu denken, welche in der Lage sind, einen schnellen Zerfall der Energiegewinnung und damit den Eintritt des Zelltodes zu verzögern.

Die jetzt vorliegenden p_H-Messungen und die Annahme einer ersatzweisen anaeroben Spaltung dürften eine reale Grundlage für diese Annahme darstellen. Die bei Behinderung der oxydativen Energiegewinnung ansteigende Glykolyse ist nicht nur die Ursache für die gemessene Acidose, sondern dürfte auch in der Lage sein, je nach der Höhe der kritischen Schwelle der verschiedenen Gewebe, den endgültigen Zelltod für eine bestimmte Zeit hinauszuzögern und damit die Schnelligkeit des Sichtbarwerdens morphologisch erkennbarer Absterbevorgänge (-Nekrose) zu bestimmen. An welcher Stelle des innerzelligen Fermentapparates sich das entstehende Energiedefizit zuerst auswirkt und damit Anlaß zu irreversiblen Schädigungen gibt, ist noch nicht endgültig geklärt. Vieles spricht für eine besondere Empfindlichkeit des Adenosintriphosphorsäure-Mechanismus', also der Energieübertragung (s. o.). Auch die erwähnten phasenoptischen Befunde scheinen das zu bestätigen, da die ersten morphologischen Veränderungen in Permeabilitätsstörungen an den verschiedensten Membranen (Zellmembran, Mitochondrienmembran) bestehen, deren intakte Funktion bekanntlich an die kontinuierliche Nachlieferung von Energie gebunden ist (Höber, Lettré, Rothschuh).

Was die zweite eingangs gestellte Frage nach den Fermenten betrifft, welche an der intravitalen Auflösung der geschädigten Hauptstückepithelien mitwirken, so läßt der eindeutige Nachweis einer Schädigungsacidose alle diejenigen Fermente in Betracht ziehen, deren Wirkungsoptimum im Sauren liegt. Ob sie aus der Zelle selbst freigesetzt werden (Autolyse) oder aus dem Serum stammen (Heterolyse), läßt sich auf Grund der vorliegenden Messungen nicht entscheiden.

Zusammenfassung

An 41 Meerschweinchen wurden p_H-Messungen in der Niere des lebenden Tieres nach vorangegangener Arterienligatur mit Hilfe der Glaselektrode ausgeführt.

Sämtliche Messungen ergaben übereinstimmend in der ersten Stunde ein Absinken der p_H-Werte, also eine Verschiebung der Gewebsreaktion nach der sauren Seite. Einzelne Kontrollmessungen über längere Zeiträume lassen aber die Möglichkeit eines geringen Wiederanstieges offen.

Die histologische Kontrolle der Einstich- bzw. Aufsatzstelle gestattet bestimmte Rückschlüsse auf die Bedingungen während des Messungsvorganges.

Untersuchungen der vorliegenden Art sind geeignet, Eigenart und Verlauf der ischämischen Hypoxydose weiter aufzuklären.

Literatur

Bauer, J.: Modellversuche zur Koagulationsnekrose. Frankf. Z. Path. **57**, 122 (1943). — Bayerle, H., G. Borger u. T. Mayr: Hoppe-Seylers Z. **243**, 227 (1936). — Bayerle, H., u. G. Borger: Beitr. path. Anat. **103**, 215 (1939). — Becker, V.: Klin. Wsch. **1955**, 577. — Beneke, R.: Beitr. path. Anat. **74**, 2 (1925). — Borger, G. T. Peters u. M. Kunz: Hoppe-Seylers Z. **217**, 255 (1933). — Borger, G., u. T. Mayr Hoppe-Seylers Z. **234**, 245 (1935). — Brederek, H.: Nucleasen: In Nord-Weidenhagen, Handbuch der Encymologie, Bd. 1, 504 (1940). — Brodersen, J.: Inaug. Diss. Rostock (1904). — Buchner, Fr.: Allgemeine Pathologie. — Cain, H.: Frankf. Z. Path. **58**, 171 (1944), Hemmung des Eintritts der Koagulationsnekrose an Implantaten durch Oxalat und durch Fermentgifte. — Colldahl, H.: Acta med. scand. (Stockh.) **129**, 113 (1947). — Fahr, E.: Virchows Arch. **304**, 317 (1939) — Frankf. Z. Path. **57**, 533 (1943). — Zbl. Path. **83**, 73 (1945). — Frunder, H.: Die Wasserstoffionenkonzentration im Gewebe lebender Tiere, nach Messungen mit der Glaselektrode. Jena: Gustav Fischer, 1951. — Grassmann, W., u. H. Müller: Amidasen, in Flaschenträger-Lehnartz Bd. 1, S. 1100, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951. — Groll, H.: Virchows Arch. **316**, 384—419 (1949). — Beitr. path. Anat. **103**, 271. (1939). — Groll, H., u. G. Merkle: Beitr. path. Anat. **92**, 518 (1933/34). —Guillery, H.: Virchows Arch. **304**, 317 (1939); **304**, 336 (1939). — Frankf. Z. Path. **53**, 522 (1939). — Höber, R.: Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe. Stämpfli u. Cie. 1947. — Holle, G., R. Burkhardt, S. Arndt u. M. Blödorn: Virchows Arch. **327**, 150 (1955). — Holle, G., u. R. Burkhardt: Wiss. Z. d. Ernst Moritz Arndt-Universität Greifsw., Jg. V (im Druck). — McInnes, D. A., and M. Dole: J. Gen. Physiol. **12**, 805 (1929). — J. Amer. Chem. Soc. **52**, 29 (1930). — Kettler, L. H.: Verh. dtsch. Ges. Path. **33**, 74 (1950). — Letterer, E.: Die allgemeine Pathologie des Stoffwechsels in Naturforschung u. Medizin in Deutschland 1939—46. Bd. 70, T. I. — Lettré, H.: Naturwissenschaften **38**, 490 (1951); **39**, 266 (1952). — Dtsch. med. J. **1952**, 414. — Lettré, H., u. R. Lettré: Naturwissenschaften **40**, 203 (1953). — Litten, M.: Z. Klin. Med. **1**, 131 (1880). — Moegen, P.: Frankf. Z. Path. **33**, 74 (1950); **34**, 333 (1951). — Mönnighoff, F. H.: Beitr. path. Anat. **102**, 87 (1939). — Müller, E.: In Handbuch d. allgem. Pathologie II/1. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer 1955. Netter, H., u. F. Leuthardt: Die Reaktion der Zellen und Gewebe, in Flaschenträger-Lehnartz Bd. II/1C S. 1156. — Rothschild, K. E.: Wiss. Z. d. Ernst Moritz Arndt-Universität Greifsw., Jg. IV, 1954/55, 549. — Schmaus, H., u. E. Albrecht: Virchows Arch. **138**, 1 (1895). — Schmidtmann, E.: Zbl. Path. **37**, 536 (1926). — Schmidtmann, M.: Zbl. Path. Erg. H. 37, 146 (1926). — Biochem. Z. **150**, 253 (1924). — Schnappauf, U.: Beitr. path. Anat. **79**, 781 (1928). — Schumann, H.: Z. exper. Med. **106**, 59 (1939). — Spek, J.: Sonderheft d. Kolloidz. **85**, 162 (1938). — Terbrüggen, A.: Beitr. path. Anat. **98**, 264 (1937) (Über den Einfluß des Blutserums auf die Nekrobiose). — Thorn, W.: in Handbuch der Physiologischen Chemie v. Flaschenträger-Lehnartz, Bd. II/1C, S. 1175. — Uher, V.: Beitr. path. Anat. **102**, 544 (1939). — Voegtlin, C., H. Kahler u. R. H. Fitch: in Abderhaldens Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. 5 Teil 10. — Warburg, O.: Stoffwechsel der Tumoren. Berlin: Springer 1926.

Professor Dr. G. Holle, Greifswald, Patholog. Institut d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 513—538 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. B. Behrens)

Substanz P, ein Polypeptid aus Darm und Gehirn mit depressiven, hyperalgetischen und Morphin-antagonistischen Wirkungen auf das Zentralnervensystem

Von

Gerhard Zetler*

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Januar 1956)

Es sollte untersucht werden, ob Substanz P (SP) nach subcutaner Injektion die Funktion des Zentralnervensystems (ZNS) beeinflussen kann. Zu diesen Versuchen wurden wir ermutigt durch unsere vorangegangenen Beobachtungen über die Art der Verteilung von SP in verschiedenen Teilen des ZNS (Zetler u. Schlosser 1955).

Es hatte sich dabei gezeigt, daß die Konzentration von SP im Gehirngewebe für jedes Areal typisch ist, und daß die SP-Konzentration sehr verschieden, selbst in eng benachbarten Teilen des Gehirns, sein kann. Prinzipiell dasselbe hatten Pernow (1953), Kopera u. Lazarini (1953) sowie Amin, Crawford u. Gaddum (1954) beschrieben. Durch gleichzeitige Untersuchung der Cholinacetylase in den verschiedenen Gehirnpartien konnten wir die auffallende Tatsache beweisen, daß SP in den Gehirngebieten, die nur wenig Acetylcholin synthetisieren, viel reichlicher vorkommt als in Teilen, die viel Acetylcholin bilden können; dies hatten schon Kopera u. Lazarini (1953) vermutet. Die Anwesenheit von SP im Gehirngewebe schien uns deshalb auf die Existenz nichtcholinergischer Nervenzellen zurückzuführen zu sein; solche Nervenzellen waren von Feldberg u. Vogt (1948) wegen der von ihnen gefundenen sehr verschiedenen Fähigkeit verschiedener Gehirnpartien zur Acetylcholin-Synthese postuliert worden. Lembeck (1953) dagegen glaubte, SP sei die Überträgersubstanz des ersten sensiblen Neurons; er wurde zu dieser Auffassung gebracht durch die auffallend hohe Konzentration an SP in den sensiblen dorsalen Spinalwurzeln und durch eine weitgehende biochemische Ähnlichkeit zwischen SP und der „Erregungssubstanz sensibler Nerven" von Hellauer u. Umrath (1948a, b). Wie dem auch sei, es war aus diesen erwähnten Arbeiten sehr wahrscheinlich geworden, daß SP eine Bedeutung für die Funktion bestimmter Teile des ZNS besitzt.

* Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Freilich fehlte ein Beweis dafür, daß SP bei Zufuhr von außen die Funktion des ZNS beeinflussen kann. In dieser Hinsicht liegen die Verhältnisse beim Darm, in dessen Wand ja auch SP vorkommt, bisher günstiger; denn ein Charakteristicum von SP ist die kontrahierende Wirkung auf den Darm.

Bald nach dem Beginn unserer Versuche erschien allerdings eine Publikation von v. Euler u. Pernow (zit. nach Pernow 1955), die bei Katzen und Kaninchen SP in die Seitenventrikel des Gehirns injizierten und unter anderem eine auffallende Beruhigung der Tiere beobachteten; bei höheren Dosen traten psychische Veränderungen auf (Bösartigkeit). Wir wissen jedoch aus den Arbeiten von Feldberg u. Sherwood (1954a, b), die zahlreiche Substanzen ebenfalls in die Seitenventrikel injizierten, daß Pharmaka bei dieser Art der Verabreichung andere Wirkungen auf das ZNS haben können als nach subcutaner oder intravenöser Injektion. Bei intraventrikulärer Injektion werden in erster Linie die Gehirnpartien um den III. Ventrikel und der Boden des IV. Ventrikels betroffen. Sehr differente Pharmaka lösten dabei identische Gruppen von Reaktionen aus. Diese Phänomene können bisher im Hinblick auf die differenten Eigenschaften der angewandten Pharmaka noch nicht erklärt werden. Wir glauben, daß die intraventrikuläre Injektion allein vorerst nicht ausreicht, um die Frage zu entscheiden, ob eine Substanz im herkömmlichen pharmakologischen Sinne auf das ZNS wirkt, ob sie also zu der Gruppe der Pharmaka gehört, deren pharmakodynamische Haupteigenschaft bei einer der üblichen Arten der Applikation und bei einer nicht als toxisch anzusehenden Dosierung die Wirkung auf das ZNS ist. v. Euler u. Pernow haben aus ihren oben erwähnten Resultaten wohl deshalb auch nicht den Schluß gezogen, SP sei zu den auf das ZNS wirkenden Substanzen zu rechnen.

Material und Methodik

Herstellung von SP. Wir hielten uns an die Methode von von Euler (1942), die wir durch einige weitere Schritte modifizierten, wodurch die Ausbeute etwas gesteigert werden konnte. Ferner stellten wir uns Proteinfraktionen mit sehr geringer SP-Aktivität her. Wir gingen im einzelnen so vor:

Rindergehirne wurden gereinigt, die Kleinhirne wegen ihres minimalen SP-Gehaltes verworfen. Mit dem „Starmix" wurden die Gehirne unter Zusatz von destilliertem Wasser zu einer Emulsion verarbeitet, die schließlich die 1,5fache Gewichtsmenge Wasser enthielt und nach Ansäuern mit H_2SO_4 auf ein p_H von 4 etwa 5 min lang gekocht wurde. Nach Filtration extrahierten wir den Rückstand noch einmal mit der gleichen Wassermenge, vereinigten die Filtrate und engten sie im Vakuum bei etwa 20° C so weit wie möglich ein. Dieses Konzentrat brachten wir mit NaOH auf p_H 8 und versetzten es dann mit der 2,5fachen Menge Äthanol (96%); das über Nacht im Eisschrank reichlich auftretende Präcipitat wurde abgetrennt, in der halben Menge Wasser aufgenommen und noch einmal wie oben mit Äthanol versetzt. Die beiden Präcipitate wurden vereinigt und noch ein drittes Mal in der

angegebenen Weise mit Äthanol extrahiert. Nach VON EULERS Originalvorschrift schritten wir nun bis zum Ende der zweiten $(NH_4)_2SO_4$-Aussalzung vor. Das so erhaltene Präcipitat trockneten wir, wonach die Ausbeute 2,72 g pro Kilogramm Frischgehirn betrug. Dieses Material befreiten wir weitgehend von $(NH_4)_2SO_4$ durch das elegante Verfahren von BEHRENS u. SEYDL (1951), wobei sich CCl_4 mit etwas Lecithin als Suspensionsmittel bewährte. Danach betrug die Ausbeute 2,07 g/kg. Nach Lösung des Pulvers in möglichst wenig Wasser, Einstellen auf p_H 8 mit NaOH und Zusatz von 4 Volumina Äthanol (96%) wurde entstehender Ammoniak in vacuo abdestilliert, der dabei verlorene Alkohol ersetzt und das Gemisch über Nacht in den Eisschrank gestellt. Bei diesem Arbeitsgang ergab sich ein aus inerten Proteinen und Na_2SO_4 bestehendes Präcipitat, das abgetrennt, in Wasser aufgenommen und noch einmal mit 4 Volumina Alkohol gefällt wurde (Rückstand: „Präcipitat A"). Die Äthanolextrakte wurden vereinigt, in vacuo möglichst stark eingeengt, zentrifugiert, das Überstehende gefriergetrocknet (Fraktionen „SPG").

Auch aus Duodenum vom Pferd stellten wir SP her (Fraktion „SPD"). Die Därme wurden eröffnet, gereinigt, von Fettgewebe und Schleim befreit und in kleine Stücke geschnitten. Diese Stücke wurden gewaschen und mit der 1,5fachen Gewichtsmenge Wasser (p_H 4) wenige Sekunden auf 100° C erhitzt, abgekühlt, im „Starmix" zerkleinert und nun ebenso wie das Gehirn zweimal in der Hitze extrahiert. Die Kochbrühe konnte nicht klar filtriert werden und enthielt noch eine große Menge inerten Eiweißes, das den Extrakt beim Abkühlen gelieren ließ; diese Gelierung beobachtete auch LEMBECK (1953). Wir vermischten deshalb den ungelierten Extrakt mit so viel Aceton, daß das unerwünschte Eiweiß ausfiel. Es ergab sich nun ein klares Filtrat, das wir nach dem oben geschilderten Schema aufarbeiteten; allerdings wurde diesmal das „Präcipitat A" verworfen.

Herstellung von SP-„freiem" Protein aus Gehirn. Wir wollten aus Gehirn ein Protein mit möglichst schwacher SP-Aktivität und möglichst geringer Verunreinigung durch anorganische Salze herstellen. Dazu lösten wir das „Präcipitat A" (siehe oben!) in möglichst wenig Wasser, zentrifugierten und fällten das klare Überstehende mit 2 Volumina Aceton. Dies wurde mit dem so erhaltenen Präcipitat noch dreimal durchgeführt. Das getrocknete und pulverisierte Präcipitat lösten wir in Wasser (Konzentration: 1 g Präcipitat in 33,4 ml Wasser), zentrifugierten, gaben zu dem klaren Überstehenden Aceton bis zu einer Endkonzentration von 50% und stellten die Mischung über Nacht in den Eisschrank. Das entstandene Präcipitat (Fraktion „PF_1") trennten wir ab und setzten zu der klaren, schwach gelb gefärbten 50%igen Acetonlösung so viel Aceton zu, daß eine 60%ige Lösung entstand. Nach einer Nacht im Eisschrank wurde die aufgetretene Fällung (Fraktion „PF_2") abgetrennt und zu dem überstehenden Aceton bis zu einer Endkonzentration von 66,7% gegeben; Fällung: Fraktion „PF_3".

Alle bei der Herstellung der SP-freien Präparate übrigbleibenden Acetonfraktionen, nicht jedoch das zum Schluß auftretende Wasser-Aceton-Gemisch, wurden gesammelt, in vacuo zu sehr kleinem Volumen konzentriert und zentrifugiert; das Sediment wurde verworfen. Beim Trocknen in vacuo in leicht gefrorenem und langsam auftauendem Zustand kam es schließlich zur Aussalzung von SP in der entstandenen gesättigten Na_2SO_4-Lösung. Nach Auflösen des ausgesalzten Materials in wenig Wasser und Gefriertrocknung erhielten wir ein Pulver, das noch 1,08% Na enthielt. Deshalb entsalzten wir die Substanz nach BEHRENS u. SEYDL (1951) und kamen so zu der Fraktion „SPG_{AC}".

Die biologische Aktivität jeder Fraktion testeten wir am isolierten Ileum des Meerschweinchens nach der Methode von FELDBERG u. TOH (1953). Als Standard diente uns ein SP-Präparat, das uns Herr Dr. B. PERNOW/Stockholm freundlicherweise überlassen hatte, wofür ihm auch an dieser Stelle gedankt sei.

Den Na- und K-Gehalt bestimmten wir mit dem Flammenphotometer. Hier die Ergebnisse:

Tabelle 1

Fraktion	Ausbeute mg/kg*	SP-Aktivität E/mg**	Na-Gehalt %	K-Gehalt %
SPG	487	8,5	0,45	0,025
SPD	626	16,5	0,48	0,06
SPG_{AC}	117	12,0	0,88	0,07
PF_1	336	0,18	0,23	0,02
PF_2	186	0,3	0,37	0,01
PF_3	194	0,5	10,0	0,06

* Kilogramm Frischgewicht der extrahierten Gehirn- oder Darmmenge.
** Milligramm Trockenpulver.

Harmin-Tremor. Zur quantitativen Registrierung dieses Phämomens bei der weißen Maus bewährte sich uns eine Vorrichtung, die wir uns in Anlehung an das qualitativ registrierende Gerät von Hara u. Kawamori (1954) bauten. Zur Aufnahme der Maus diente ein leichtes Metallkästchen (7 cm lang, 5 cm breit und 4 cm hoch) mit einem verschließbaren Deckel aus Drahtgeflecht. Dieses Kästchen ruhte auf zwei an seinen beiden Schmalseiten fest angebrachten vertikalen, nach unten zeigenden Uhrfedern (5 cm lang). Da jede Feder mit ihrer Breitseite an einer Schmalseite des Kästchens befestigt und mit ihrem unteren Ende fixiert war, konnte das Kästchen nur in der Richtung seiner Längsachse schwingen. Die Eigenschwingung des Gerätes betrug etwa 30 Hertz. Nach Hara u. Kawamori (1954) hat der Harmin-Tremor der Maus eine Frequenz von 15—20 Hz. In dieser Größenordnung lag auch die Frequenz unseres Kästchens, wenn in ihm eine Maus mit Harmin-Tremor saß. Die Schwingungen des Kästchens wurden von einer Schmalseite aus durch einen Faden über eine Rolle in die Vertikale umgeleitet und auf einen Arbeitssammler der Firma B. Braun/Melsungen übertragen. Das ganze System beginnt erst dann zu arbeiten, wenn die Impulse, die von der Maus in rhythmischer Folge ausgehen, eine bestimmte Intensität überschreiten; ganz feiner Tremor wird also nicht registriert. Gestaltet man das System durch Belastung des Arbeitssammlers oder durch stärkere Federn etwas weniger empfindlich, so stören Spontanbewegungen und Putzen der Tiere nicht mehr. In unserem Falle ergaben sich innerhalb von 35 min nach der subcutanen Injektion von 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung im Mittel 3,5, nach 7 mg/kg Harmin 59 Kontakte. Damit war die Empfindlichkeit dieser relativ rohen mechanischen Registriermethode für unsere Zwecke ausreichend.

Bulbocapnin-Katatonie. Dieses Phänomen registrierten wir in Anlehnung an Pulewka (1950), indem wir weiße Mäuse nach der intraperitonealen Injektion von 15 mg/kg Bulbocapnin-Hydrochlorid an die Mitte eines vertikalen Stabes ansetzten, der 60 cm lang, 1,2 cm dick und mit 0,1 cm dickem Bindfaden umwickelt war. Die Mäuse wurden immer mit dem Kopf nach oben angesetzt und 50 sec lang beobachtet. Während eine normale Maus am Stabe auf- und abläuft, sitzt die Bulbocapnin-Maus ruhig da und erträgt dabei ungewöhnliche Haltungen, ein Zeichen der Katatonie. Wenn eine Maus im Laufe des 50 sec dauernden Beobachtungszeitraumes mindestens 30 sec lang keine Laufbewegungen machte, so galt dies als positives Resultat; geringfügige Haltungsänderungen wurden nicht als Fortbewegung gewertet. In Zweifelsfällen setzten wir die Maus nach Ablauf der ersten 20 sec noch einmal an den Stab an. Wir verwerteten als Maß für die Stärke der

Bulbocapninwirkung die Anzahl der positiven Beobachtungen, die nach der Injektion des Pharmakons im Abstand von je 5 min erhoben werden konnten. Der Versuch galt als beendet, wenn bei einer Maus 3 im Abstand von je 5 min vorgenommene Beobachtungen ein negatives Resultat hatten. Multipliziert man die Anzahl der positiven Beobachtungen mit 5, so erhält man die ungefähre Wirkungsdauer des Bulbocapnins in Minuten.

Pikrotoxin-Krampf. 7,5 und 6 mg/kg Pikrotoxin wurden bei weißen Mäusen subcutan in je 0,3 ml 0,9%iger NaCl-Lösung injiziert. Sehr deutlich ließen sich 3 Stadien der Pikrotoxin-Wirkung beobachten: Zunächst trat deutliches Zittern der Extremitäten und des Kopfes auf, dann die eigentlichen Krämpfe und schließlich der Tod. Wir verwerteten die Latenzzeit vom Moment der Injektion bis zum Auftreten jedes der drei Stadien. Eine Verlängerung der Latenzzeiten wurde als Abschwächung der Wirksamkeit des Pikrotoxins gewertet. Diese Auffassung ist berechtigt, wie die Ergebnisse zeigen werden.

Cardiazol[1]*-Krampf.* Zunächst bestimmten wir die Dosen, nach denen alle Mäuse Krämpfe bekamen. Sie lagen mit 110 mg/kg subcutan (Letalität 17%) und 80 mg/kg intraperitoneal (Letalität 0%) höher, als wir nach den Angaben der Literatur erwartet hatten; den Grund dafür kennen wir nicht. Wir bestimmten die Latenzzeiten bis zum Eintritt der Krämpfe; nach Brock, Lorenz u. Veigel (1954) lassen sich so synergistische oder antagonistische Wirkungen erkennen.

Lokomotorische Aktivität der Maus. Das bei zentraler Erregung gesteigerte Laufen der Mäuse registrierten wir in einer Apparatur, die von Westerman (1950) unter Behrens entwickelt und kürzlich von Malorny (1955b) geschildert worden ist. Für unsere Zwecke hatten wir das Gerät etwas modifiziert; so entsprach bei uns ein Kontakt 7,5 cm Wegstrecke. Die Versuche begannen immer morgens 10 Uhr. 40 min nach subcutaner Injektion der erregenden Substanzen gaben wir unsere Präparate ebenfalls subcutan und beobachteten 35 min lang. Für jedes Individuum wurde die mittlere Laufgeschwindigkeit (= Kontakte/min) während der 35. bis 40. Minute nach der Injektion der erregenden Substanzen gleich 100 gesetzt und die mittlere Geschwindigkeit während der 35 min nach Verabreichung unserer Präparate als entsprechender Prozentsatz ausgedrückt. Diese Art der Auswertung schien uns die einzig richtige zu sein, da sie für jedes Individuum die Abänderung der bereits voll entwickelten Morphin- oder Pervitin[2]-Wirkung erfaßt. Eine weitere Rechtfertigung dieser Betrachtungsweise liegt darin, daß sie die von Versuch zu Versuch schwankende Empfindlichkeit der einzelnen Maus für zentrale Stimulantien berücksichtigt. Schließlich ist auch die Fehlerbreite der mittleren Reaktion eines Kollektivs bei diesen Versuchen so groß, daß man bei Verarbeitung der absoluten Zahlenwerte kaum zu signifikanten Resultaten kommt, wenn man nicht eine große Anzahl von Mäusen verwendet. — Mäuse, die nur schwach auf Morphin oder Pervitin reagierten, haben wir vorher eliminiert.

Sedative Wirkung. Eine solche Wirkung ist erfahrungsgemäß an Tieren, die nicht zuvor durch Stimulantien in eine Erregung versetzt wurden, schwer zu prüfen. Es gelingt jedoch leicht, schwache sedative Wirkungen quantitativ zu erfassen, wenn man sich die Tatsache zunutze macht, daß unvorbehandelte Mäuse einen leichten Erregungszustand zeigen, wenn man sie in ein ungewohntes Milieu bringt: Sie suchen durch Schnuppern, Herumlaufen, Aufrichten usw. möglichst schnell die neue Umgebung kennen zu lernen. Dies ist eine Äußerung der Vigilität, also der Fähigkeit, „die Aufmerksamkeit einem neuen Gegenstand (namentlich einem von außen kommenden Reiz) zuzuwenden" (Bleuler 1943). Die folgende Methode wollen wir deshalb weiterhin „Vigilitätstest" nennen: Nachdem die Maus 10 min

[1] Warenzeichen! (Pentamethylentetrazol).

[2] Warenzeichen! (1-Phenyl-2-methylaminopropanhydrochlorid).

vorher den auf sedative Wirksamkeit zu prüfenden Stoff erhalten hat, wird sie in einen leichten Käfig aus Drahtgeflecht gesetzt, der an einer senkrechten Feder hängt. Vom Ansatzpunkt der Feder aus führt ein Faden senkrecht nach oben zu einem Arbeitssammler. Wir verwendeten die Zahl der vom Arbeitssammler während der ersten 10 min gegebenen Kontakte. 7—10 min nach dem Einsetzen der Maus in den Zitterkäfig beginnt bei vielen Tieren allmählich die Gewöhnung an das neue Milieu und damit die Beruhigung.

Analgesieprüfung. Feststellung der Reizschwelle am Schwanz der weißen Maus mittels zweier Elektroden, die einen Abstand von 1 cm hatten, wobei die körpernahe Kathode 1 cm von der Schwanzwurzel entfernt war; gereizt wurde mit Rechteckimpulsen („Megatest"-Gerät) von 2 Hz, Dauer des Einzelreizes 4 msec. Die Reizschwelle galt als erreicht, wenn die Maus auf zwei aufeinanderfolgende Reize gleicher Intensität mit je einem Schrei (Piepsen) reagierte. Die normale Reizschwelle lag zwischen 0,5 und 1,2 Milliamp. Bei den Versuchen der Tab. 10 wurde alle 10 min gereizt; nach der 50. Minute wurde die Beobachtung abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt (nach 40 min) ist der Morphin-Effekt im allgemeinen voll ausgeprägt. Es zeigte sich, daß die maximalen Änderungen der Reizschwelle nicht immer bei allen Substanzen zur gleichen Zeit auftraten. Wir bildeten deshalb zur rohen Orientierung zunächst bei jedem Versuch die Mittelwerte der gemessenen Reizstromstärken und wählten dann an Hand dieser Mittelwerte für die 30., 40. und 50. Minute den Zeitpunkt der stärksten Änderung für die weitere Bearbeitung aus. Diese bestand in der Berechnung der mittleren Differenz, die sich aus den einzelnen für jedes Individuum gefundenen Differenzen zum jeweiligen Normalwert ergab, sowie des mittleren intra-individuellen Fehlers. — Wir hielten dieses Vorgehen für gerechtfertigt angesichts der heterogenen Natur der angewandten Substanzen, die als erste Orientierung darüber aufzufassen ist, wie weit unsere Substanzen die Reizschwelle überhaupt in irgendeiner Richtung beeinflussen können. — Die in Abb. 4 dargestellten Versuche wurden folgendermaßen ausgewertet: Der Morphineffekt in der 30. Minute nach der Morphininjektion, also die dann vorhandene Differenz zur normalen Reizschwelle (in Milliamp.) eines jeden Tieres, wurde jeweils gleich 100 gesetzt. Alle weiteren in den nächsten Zeitabschnitten beobachteten Morphin-Effekte wurden dann für jedes Tier als Prozentsatz seines 30 min-Wertes ausgedrückt, die Mittelwerte nach Gaddum (1953) berechnet.

Evipan[1]*-Schlafdauer.* Das Hypnoticum wurde bei weißen Mäusen intravenös injiziert (55 mg/kg). 10 min vorher gaben wir die zu prüfenden Substanzen in 0,4 ml 0,9%iger NaCl-Lösung subcutan bzw. bei den Kontrollen die NaCl-Lösung allein. Lysergsäurediäthylamid (10 mg/kg) injizierten wir 1 Std vor der Evipan-Injektion subcutan, wie dies auch Shore, Silver u. Brodie (1955) getan hatten. Der Versuch galt als beendet, wenn sich die Tiere mit Erfolg aus der Seitenlage aufrichteten.

Atemfrequenz des Meerschweinchens. Mit einer Serre fine wurde ein Faden an einer durch die Atemtätigkeit bewegten Hautstelle der Flanke befestigt und so die Atembewegungen über einen Hebel auf eine berußte Trommel aufgezeichnet. Die Tiere saßen in einem großen Becherglas, dessen Wände mit Papier beklebt und dessen obere Öffnung mit einem Stück Papier bedeckt war.

Elektroschock. Wir prüften nach der Methodik von Brown, Schiffman, Swinyard u. Goodman (1953) die Wirkung von SP auf den „psychomotorischen" Elektroschock sowie auf den minimalen Elektroschock („minimal electroshock threshold test"). Als Reizgerät diente der „Megatest".

Statistik. Alle Mittelwerte und ihre mittleren Fehler — mit Ausnahme der mittleren Differenzen und ihrer mittleren intra-individuellen Fehler — berechneten

[1] Warenzeichen! (N-Methyl-Cyclohexenylmethyl-barbitursäure).

wir nach Gaddum (1953). Die Mittelwerte wurden mittels der t-Verteilung miteinander verglichen. Wir nahmen an, daß kein echter Unterschied zwischen zwei Mittelwerten vorhanden war, wenn $p > 0{,}05$ war. Die $\varkappa^2$-Werte errechneten wir mit 2×2-Tafeln.

Chymotrypsin-Inaktivierung von SP. Wir benutzten das kristallisierte Ferment-Präparat der Firma Worthington Chemical Sales Co., Freehold, New Jersey, und richteten uns nach Dunér, v. Euler u. Pernow (1954). Wegen der konzentrierteren SP-Lösung (100 mg/ml = 850 E/ml statt wie bei obigen Autoren 50 E/ml) verdoppelten wir die Chymotrypsin-Konzentration und gaben demnach auf 50 E SP 0,1 mg Chymotrypsin. Ferner inkubierten wir das Gemisch nicht 30, sondern 90 min lang.

Fermentativer Abbau von SP durch Gehirngewebe. Hierbei lehnten wir uns an die Methode von Gullbring (1943) an: Frisch entnommene Mäusegehirne wurden mit etwas NaCl-Lösung zerrieben, das Material zweimal je 2 Std mit Aceton entwässert und über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet. Das getrocknete Gewebe (pro Gehirn 60–70 mg) wurde pulverisiert und mit 1,5 ml 2%iger NaCl-Lösung pro 50 mg Substanz 10 min lang unter häufigem Umrühren extrahiert, zentrifugiert, das Überstehende abgetrennt und der Rückstand noch einmal extrahiert (1,0 ml 2%iger NaCl-Lösung pro 50 mg Ausgangsmaterial). Beide Extrakte wurden vereinigt und 24 Std in einem Säckchen aus Kollodium gegen nach 12 Std erneuertes destilliertes Wasser dialysiert. Die Menge des Dialysates wurde gemessen; bezogen auf das Gewicht des extrahierten Trockenmaterials lag schließlich eine „Gehirn"-Konzentration von 17 mg/ml vor. Dem dialysierten Extrakt setzten wir pro Milliliter 2 mg unseres Präparates SPG (8,5 E/mg) zu, die SP-Konzentration im Ansatz betrug also immer 17 E/ml. Diesen Ansatz inkubierten wir 1 Std lang bei 38° C in einem Wasserbad und beendeten den fermentativen Vorgang durch 1 min langes Einstellen der Ansätze in kochendes Wasser. Die SP-Aktivität der Ansätze prüften wir am isolierten Ileum des Meerschweinchens nach Feldberg u. Toh (1953).

Ergebnisse

Wir begannen unsere Untersuchungen mit der Prüfung der Frage, ob SP die Wirkungen der Alkaloide Harmin und Bulbocapnin auf das ZNS beeinflussen kann. Dazu ermutigten uns unsere früheren Befunde (Zetler u. Schlosser, 1955), wonach SP besonders reichlich in Gehirnpartien vorkommt, die wie Striatum (besonders Globus pallidus), Hypothalamus und Substantia nigra Teile des extrapyramidal motorischen Systems sind.

Nach Hara (1953) wirken Harmin und Bulbocapnin bei der Maus nur dann in der gewohnten Weise, wenn Striatum und Hypothalamus intakt sind. Aber bekanntlich gehören auch Teile der Hirnrinde zum extrapyramidal motorischen System. Hara fand nun durch Exstirpationsversuche, daß die typische Harmin-Wirkung an andere Rindenareale gebunden ist als die Bulbocapnin-Wirkung. Er postulierte deshalb für den Bereich der Hirnrinde ein Harmin-empfindliches System, das eine Zunahme der Motilität und eine Abnahme des Muskeltonus bewirkt, und ein Bulbocapnin-empfindliches System, das eine Abnahme der Motilität und eine Zunahme des Muskeltonus auslöst. Dies erinnerte uns an die auffallend hohe SP-Konzentration, die wir früher im Gyrus cinguli anterior gefunden hatten. Dieses Gebiet ist bekanntlich ein Suppressor-Areal, bei dessen elektrischer oder chemischer Reizung starke Hemmungsphänomene und unter anderem Tonusabnahme der Muskulatur beobachtet wurden (Übersicht bei Jefferson, 1950).

Schon unsere ersten Harmin-Versuche zeigten klar, daß SP nach subcutaner Injektion bei der Maus den Tremor abschwächen oder bei genügend hoher Dosierung sogar verhindern kann. Tab. 2 zeigt, daß 1 mg/g SPG den Tremor stark vermindert und daß die gleiche Dosis PF_1 diese Wirkung nicht hat. Die beiden bisher bekannten Hauptwirkungen von SP, nämlich die blutdrucksenkende und die darmkontrahierende Wirkung, werden durch die Behandlung der Substanz mit Trypsin (v. Euler, 1942) und Chymotrypsin (Pernow, 1953) zerstört. Da auch die gegen den Harmin-Tremor gerichtete Wirksamkeit von SP durch Chymotrypsin beseitigt wurde, kann auch sie als eine typische Wirkung von SP gelten, die an die Intaktheit dieses Polypeptid-Moleküls geknüpft ist. Ferner ergibt sich daraus, daß die Wirkungslosigkeit des Präparates PF_1 auf seiner geringen SP-Aktivität beruht.

Tabelle 2. *Intensität des Harmin-Tremors der weißen Maus nach subcutaner Injektion von 7 mg/kg Harmin-Hydrochlorid, ausgedrückt durch die durchschnittliche Anzahl der Kontakte des Arbeitssammlers innerhalb von 35 min nach der Harmin-Injektion*

Versuch Nr.	5 min vor Harmin subcutan injiziert	n	Mittlere Anzahl der Kontake	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
1	0,4 ml NaCl-Lösung (0,9%)	29	58,5	47,9—71,4
2	PF_1 1 mg/g = 0,18 E/g	19	52,5	48,5—56,8
3	SPG 1 mg/g = 8,5 E/g	25	17,4	9,4—32,1
4	SPG 1 mg/g Chymotrypsin-inaktiviert	12	63,2	47,0—84,9

Unterschied zwischen Versuch Nr. 1 und 3: $p < 0{,}01$,
Unterschied zwischen Versuch Nr. 2 und 3: $p < 0{,}001$,
Unterschied zwischen Versuch Nr. 3 und 4: $p < 0{,}01$.

Sofort erhob sich die Frage, ob SP vielleicht die Resorption des später gegebenen Harmins behindert oder verzögert hatte; auch das hätte ja zu einer verminderten Wirksamkeit des Harmins führen müssen. Deshalb gaben wir in weiteren Versuchen zuerst Harmin und erst dann, wenn der Tremor bereits einige Minuten vorhanden war, PF_1 oder SPG. Die Tab. 3 zeigt, daß der Harmin-Tremor bereits in der Zeit von der 5.—10. Minute nach der Harmin-Gabe voll entwickelt war und sich während der nächsten 30 min auf durchschnittlich gleicher Intensität hielt (für diese Versuche wurden solche Mäuse ausgewählt, die einen besonders lang andauernden und gleichmäßigen Tremor zeigten). Die Mittelwerte für die 11.—35. Minute bedeuten natürlich nicht, daß der Tremor immer von gleichbleibender Stärke war (die Anzahl der in diesem Zeitraum insgesamt aufgezeichneten Kontakte wurde durch die Anzahl der Minuten dividiert). Bei diesen Versuchen blieb wiederum das SP-freie Präparat wirkungslos, während SPG trotz des bei seiner Verabreichung bereits vorhandenen

Tremors als Harmin-Antagonist wirkte. Damit ist die oben gestellte Frage entschieden: Der in Tab. 2 dargestellte SP-Effekt kann nicht auf einer Beeinträchtigung der Harmin-Resorption beruhen, vielmehr muß SP die Funktion des ZNS direkt beeinflußt haben.

Es ist klar, daß man zwar die verminderte, nicht aber die verstärkte Wirksamkeit eines Pharmakons auf eine Behinderung der Resorption zurückführen kann. Deshalb widerlegen auch die Ergebnisse unserer Versuche mit Bulbocapnin (Tab. 4) den Gedanken an eine Reduzierung der Resorptionsgröße durch SP. SP verlängert die Wirkungsdauer von Bulbocapnin, was als Verstärkung der Wirksamkeit dieses Pharmakons aufgefaßt werden kann. SP-freies Protein war ebenso wie das durch Chymotrypsin inaktivierte SP-Präparat wirkungslos. Neu ist in Tab. 4

Tabelle 3. *Beeinflussung des bereits voll entwickelten Tremors der weißen Maus nach 7 mg/kg Harmin durch SP aus Gehirn.*
Die Intensität des Tremors ist ausgedrückt durch die durchschnittliche Anzahl der Kontakte des Arbeitssammlers pro Minute

10 min nach Harmin subcutan injiziert	n	Anzahl der Kontakte pro Minute		p*
		5.—10. min nach Harmin	11.—35. min nach Harmin	
0,4 ml NaCl-Lösung (0,9%) .	12	4,2 (3,70—4,82)**	3,9 (3,30—4,63)	
PF_1 1 mg/g = 0,18 E/g . . .	7	4,5 (3,21—6,26)	3,8 (3,24—4,56)	> 0,9
SPG 1 mg/g = 8,5 E/g . . .	7	4,9 (4,00—5,95)	1,48 (1,09—1,60)	< 0,02

* Verglichen sind die zur 11.—35. Minute gehörenden Werte.
** Mittlerer Fehler des Mittelwertes.

Tabelle 4. *Beeinflussung der Wirksamkeit von Bulbocapnin durch unsere Präparate.*
Bulbocapnindosis: 15 mg/kg intraperitoneal (Konzentration der Lösung: 1,5 mg/ml)

Versuch Nr.	gleichzeitig subcutan injiziert	n	Mittlere Anzahl positiver Resultate	Mittlerer Fehler des Mittelwertes	p
1	0,3 ml NaCl-Lösung (0,9%)	16	3,5	2,0— 4,1	
2	PF_2 1 mg/g = 0,3 E/g	8	2,95	2,5— 3,5	> 0,4
3	SPG 1 mg/g = 8,5 E/g	10	9,89	8,9—11,0	< 0,001
4	SPD 1 mg/g = 16,5 E/g	7	15,6	13,6—18,1	< 0,001
5	SPG 1 mg/g Chymotrypsin-inaktiviert	8	3,3	2,6— 4,04	> 0,7

Unterschied zwischen Versuch Nr. 3 und 4: $p < 0{,}05$.

der Versuch mit dem aus Darm hergestellten SP-Präparat SPD, das ebenfalls und sogar wesentlich stärker als SPG auf das ZNS wirkte. Diese stärkere Wirksamkeit kann wohl damit erklärt werden, daß dieses Präparat am isolierten Ileum des Meerschweinchens doppelt so aktiv war wie das Präparat SPG, also doppelt soviel SP enthielt.

Bei unseren bisherigen Versuchen war uns aufgefallen, daß die Mäuse nach der subcutanen Injektion von SP sehr ruhig saßen und offenbar an ihrer Umwelt kein Interesse mehr zeigten; gar nicht selten konnten wir beobachten, daß Mäuse nach der SP-Injektion spontan abnorme Haltungen einnahmen und einige Minuten lang ertrugen (Katatonie?). Das regte uns dazu an, SP auf sedative Wirksamkeit hin mit dem Vigilitätstest (siehe Methodik!) zu prüfen. Aus Tab. 5 geht hervor, daß die SP-Präparate aus Gehirn und Darm tatsächlich eine sedative Wirksamkeit haben, die dem SP-freien Protein fehlt. Dabei war in diesen Versuchen die Dosierung der SP-Präparate nur 0,3 mg/g gegenüber 1,0 mg/g bei den Versuchen mit Harmin und Bulbocapnin. Das SP-Präparat aus Darm SPD zeigte angedeutet, jedoch nicht signifikant, eine etwas stärkere sedative Wirksamkeit als das Präparat SPG aus Gehirn.

Tabelle 5. *Sedative Wirkung von SP bei weißen Mäusen, geprüft mit dem Vigilitätstest.* Verwertet wurde die durchschnittliche Anzahl von Kontakten des Arbeitssammlers innerhalb von 10 min nach dem Einsetzen der Mäuse in den Zitterkäfig

10 min vorher injiziert	n	Mittlere Anzahl der Kontakte	Mittlerer Fehler des Mittelwertes	p
0,4 ml NaCl-Lösung (0,9%) .	10	33,5	27,3—41,0	
PF_1 0,3 mg/g = 0,06 E/g . .	10	31,2	26,4—36,9	$> 0{,}7$
SPG 0,3 mg/g = 2,8 E/g . .	10	16,0	13,3—19,2	$< 0{,}02$
SPD 0,3 mg/g = 5,5 E/g . .	10	12,3	10,4—14,6	$< 0{,}01$

Eine beruhigende Wirkung von SP ergab sich auch an der durch Morphin oder Pervitin erregten Maus (Tab. 6). Auch bei diesen Versuchen war PF_2 wirkungslos und SP aus Darm stärker wirksam als SP aus Gehirn. Der Morphin-Effekt nach dem mit Chymotrypsin behandelten Präparat SPG unterscheidet sich zwar knapp vom Morphin-Kontrollwert (Versuch Nr. 1), jedoch nicht von dem Effekt des SP-freien Präparates PF_2, wohl aber von dem des Präparates SPG; die typische SP-Wirksamkeit ist also auch hier durch Chymotrypsin zerstört worden. SP wirkte auch gegen Pervitin. Allerdings wurde die Pervitin-Wirkung nicht ebenso stark abgeschwächt wie die von Morphin. Dies ist um so auffälliger, als die Pervitin-Wirkung im Gegensatz zu der von Morphin nach der 40. Minute schon normalerweise bereits wieder eindeutig abnimmt. Man hätte erwarten können, daß SP gegen Pervitin deshalb weitaus stärker als gegen Morphin wirken würde.

SP verstärkt die Barbiturat-Narkose (Tab. 7). Bei diesen Versuchen wirkte SP aus Darm (SPD) wiederum deutlich stärker als SP aus Gehirn (SPG), während das SP-freie Protein PF_2 wirkungslos blieb; deshalb verzichteten wir auch zur Einsparung von SP auf die Erprobung von Chymotrypsin-inaktivierter SP. In Versuch Nr. 5 haben wir den Mäusen 1 Std vor Evipan Lysergsäurediäthylamid (LSD) injiziert, um zu sehen,

Tabelle 6. *Antagonistische Wirkung von SP gegen die psychomotorische Morphin- und Pervitin-Erregung der weißen Maus*

Stimulans	Nr.	40 min nach Stimulans subcutan injiziert	n	Mittlere Intensität der Erregung*	Mittlerer Fehler des Mittelwertes	p
Morphin 15 mg/kg subcutan	1	0,4 ml NaCl-Lösung (0,9%)	9	106,4	99,5—113,6	
	2	PF_2 1 mg/g = 0,3 E/g	9	88,2	83,0—93,7	$> 0{,}05$
	3	SPG 1 mg/g = 8,5 E/g	9	54,2	48,7—60,4	$< 0{,}001$
	4	SPG 1 mg/g Chymotrypsin-inaktiviert	5	82,9	77,1—89,2	$< 0{,}05$
	5	SPD 1 mg/g = 16,5 E/g	5	33,4	29,9—38,0	$< 0{,}001$
Pervitin 3,5 mg/kg subcutan	6	0,4 ml NaCl-Lösung (0,9%)	8	74,8	70,4—79,5	
	7	SPD 1 mg/g = 16,5 E/g	8	49,7	43,1—57,2	$< 0{,}02$

* Mittlere prozentuale Geschwindigkeit der Mäuse in der 40.—75. Minute nach der Injektion des Stimulans, bezogen auf die mittlere Geschwindigkeit in der 35. bis 40. Minute.
Unterschied zwischen Versuch Nr. 3 und 4: $p < 0{,}01$.
Unterschied zwischen Versuch Nr. 2 und 4: $p > 0{,}5$.
Unterschied zwischen Versuch Nr. 3 und 5: $p < 0{,}02$.
Unterschied zwischen Versuch Nr. 1 und 6: $p < 0{,}01$.

Tabelle 7. *Dauer der Narkose (Seitenlage) bei der weißen Maus nach intravenöser Injektion von 55 mg/kg Evipan-Natrium*

Nr.	10 min vor Evipan subcutan injiziert	n	Mittlere Dauer der Narkose in min	Mittlerer Fehler des Mittelwertes	p
1	0,4 ml NaCl-Lösung (0,9%)	18	9,6	8,1—11,5	
2	PF_2 1 mg/g = 0,3 E/g	10	10,9	10,3—11,5	$> 0{,}6$
3	SPG 1 mg/g = 8,5 E/g	10	21,3	19,1—23,7	$< 0{,}001$
4	SPD 1 mg/g = 16,5 E/g	6	32,1	29,2—35,3	$< 0{,}001$
5	LSD 10 mg/kg, 50 min vor SPG 1 mg/g	10	14,3	13,1—15,5	$> 0{,}05$

Unterschied zwischen Versuch Nr. 3 und 4: $p < 0{,}02$.
Unterschied zwischen Versuch Nr. 3 und 5: $p < 0{,}01$.

ob dadurch die Wirksamkeit von SPG verändert würde. Dazu hatten uns die Versuche von Shore, Silver u. Brodie (1955a, b) angeregt. Diese Autoren gingen von der Hypothese aus, daß die beruhigende Wirkung von Reserpin auf dem Umwege über eine Freisetzung von 5-Oxytryptamin (Enteramin oder Serotonin) zustande kommt (Pletscher, Shore u. Brodie 1955); sie konnten durch Vorbehandlung der Mäuse mit dem Serotonin-Antagonisten LSD tatsächlich die Verstärkung der Evipan- und Äthanol-Narkose durch Serotonin und Reserpin weitgehend

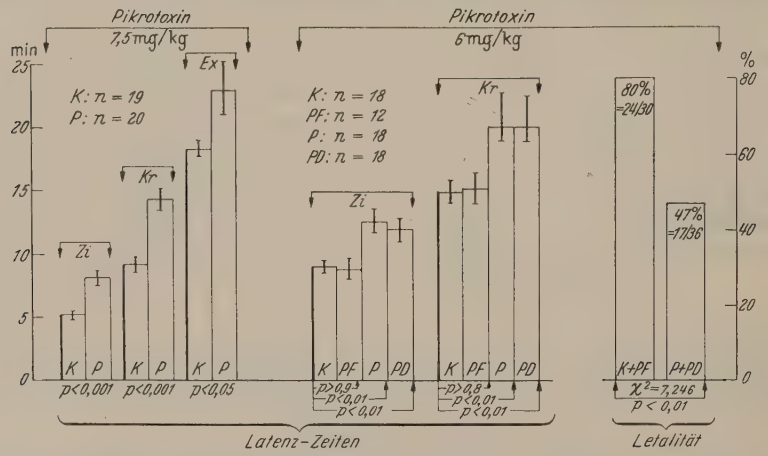


Abb. 1. Modifizierung der zentralen Pikrotoxin-Wirkungen bei weißen Mäusen durch folgende Substanzen, die 7 min vor der subcutanen Pikrotoxin-Gabe ebenfalls subcutan verabreicht wurden: *K* 0,3 ml 0,9%iger NaCl-Lösung; *PF* 1 mg/g PF_2 (= 0,18 E/g); *P* 1 mg/g SPG (= 8,5 E/g); *PD* 1 mg/g SPD (= 16,5 E/g). *Zi* Zittern des Kopfes und der Extremitäten; *Kr* Konvulsionen; *Ex* Exitus letalis. Linke Ordinate: Latenzzeit in Minuten; rechte Ordinate: Letalität in Prozent. Eingezeichnet sind die mittleren Fehler der Mittelwerte

verhindern. LSD allein beeinflußte übrigens die Evipan-Narkose nicht. In unserem Versuch Nr. 5 verminderte LSD den SPG-Effekt. Auch in den Versuchen der eben zitierten Autoren konnte LSD die Wirkung von Serotonin und Reserpin meistens nicht völlig beseitigen. — Wenn es auch voreilig wäre, aus unserem Versuch Nr. 5 zu folgern, SP verstärke die Evipan-Narkose ähnlich wie Reserpin über eine Freisetzung von Serotonin, so geht aus ihm doch hervor, daß sich die Wirkung von SP auf das ZNS pharmakologisch modifizieren läßt.

Die Ergebnisse unserer Versuche mit Pikrotoxin zeigt Abb. 1, aus der hervorgeht, daß SP die Wirkung von Pikrotoxin abschwächt, indem sie den Eintritt der einzelnen Effekte verzögert. Daß dies tatsächlich einer Verminderung der Pikrotoxin-Wirksamkeit entspricht, kann daraus geschlossen werden, daß nach 7,5 mg/kg Pikrotoxin Zittern und Krämpfe signifikant früher eintreten als nach 6 mg/kg dieser Substanz. SP aus Darm wirkte gegenüber Pikrotoxin ebenso wie SP aus Gehirn, SP-freies

Protein aus Gehirn war wirkungslos. Vereinigt man die Versuche, in denen die Mäuse mit NaCl-Lösung oder PF_1 vorbehandelt waren, und vergleicht man sie mit den vereinigten SP-Versuchen, so erkennt man, daß sich die Letalität der Versuche mit 6 mg/kg Pikrotoxin durch Vorbehandlung der Mäuse mit SP von 80% auf 47% vermindert hat. Dies ist die zweite Stütze unserer Behauptung, die Zunahme der Latenzzeit bis zum Auftreten der Pikrotoxin-Wirkungen entspräche einer Abschwächung der Wirksamkeit dieses Pharmakons.

Gegen Cardiazol jedoch war SP wirkungslos (Tab. 8). Dies ist besonders auffallend, da die Stimulierung des ZNS durch Cardiazol in unseren Versuchen wesentlich milder als die durch Pikrotoxin war; denn

Tabelle 8. *Wirkungslosigkeit von SP gegenüber Cardiazol-Krämpfen bei weißen Mäusen*

Verabreichte Substanzen		n	Anzahl der Todesfälle	Mittlere Latenzzeit in min	Mittlerer Fehler des Mittelwertes	p
Cardiazol 110 mg/kg subcutan	0,4 ml NaCl-Lösung (0,9%) 10 min vorher subcutan	12	2	11,8	10,9—12,9	$> 0{,}8$
	SPG 1 mg/g = 8,5 E/g 10 min vorher subcutan	12	3	11,6	10,3—13,1	
Cardiazol 80 mg/kg intraperitoneal	NaCl-Lösung wie oben	16	0	2,4	2,1—2,8	$> 0{,}5$
	SPG wie oben	16	2	2,9	2,3—3,8	

nach Cardiazol war die Letalität im Vergleich zu der nach Pikrotoxin minimal. Trotzdem zeigte die Letalität bei den Cardiazol-Versuchen nach SP eine ansteigende Tendenz. Die Latenzzeiten bis zum Auftreten der Cardiazol-Krämpfe änderten sich durch die Vorbehandlung der Mäuse mit SP nicht. Daraus kann zum mindesten geschlossen werden, daß SP die Resorption von Pharmaka nach subcutaner oder intraperitonealer Verabreichung nicht beeinflußt.

Ebenfalls wirkungslos war SP bei der weißen Maus gegenüber dem Elektroschock. Bei der Anwendung des psychomotorischen Elektroschocks (Parameter: 5 Hz, 0,2 msec, 15 Milliamp.) reagierten 8 von 16 Mäusen mit einem Anfall, wenn sie 15 min vorher 0,3 ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung subcutan erhalten hatten, und 7 von 16 Mäusen mit einem Anfall, wenn statt dessen 15 min vorher 1 mg/g SPG (= 8,5 E SP) injiziert worden war. Da nach Brown, Schiffman, Swinyard u. Goodman (1953) zur Unterdrückung des psychomotorischen Elektroschocks weitaus höhere Dosen der Antikonvulsiva nötig sind als bei Anwendung des minimalen Elektroschocks („minimal electroshock threshold test"), wandten wir

Tabelle 9. *Einfluß von SP auf die zentralen Wirkungen von 1 mg/kg Strychninnitrat subcutan bei weißen Mäusen*

12 min vor Strychnin subcutan injiziert	n	Latenzzeit bis zum Auftreten von Zuckungen in min	p	Anzahl krampfender Tiere	x^2	p	Anzahl der Todesfälle	x^2	p
0,4 ml NaCl-Lösung (0,9%)	14	3,8 (3,3—4,3)*		12 (= 85%)			8 (= 57%)		
SPG_{AC} 1 mg/g = 12 E/g	12	9,6 (8,5—10,8)	< 0,001	2 (= 17%)	12,66	< 0,001	1 (= 8%)	6,825	< 0,01
PF_1 1 mg/g = 0,18 E/g	8	4,0 (3,6—4,5)	> 0,7	6 (= 75%)	0,3997	> 0,5	5 (= 62%)	0,0592	> 0,8

* Mittlerer Fehler des Mittelwertes.

auch diese letztere Methode an. Bei einer Einzelreizdauer von 200 msec lagen die individuellen Schwellen-Stromstärken bei unseren Mäusen zwischen 6,6 und 7,8 Milliamp. Wir injizierten nun 15 min vor der Reizung 1 mg/g SPG und reizten jede Maus mit 110% der jeweiligen Schwellen-Stromstärke. Alle Mäuse zeigten einen Anfall. Zwei Tage später machten wir einen Kontroll-Versuch mit 100% der Schwellen-Stromstärke und reizten weitere 2 Tage später nach Vorbehandlung der Mäuse mit 1 mg/g SPD (= 16,5 E SP) nur mit 100% der jeweiligen Schwellen-Stromstärke. Auch jetzt reagierten alle Tiere mit einem Anfall. SP beeinflußt also den Elektroschock nicht.

Auch die Nicotin-Krämpfe der weißen Maus wurden durch SP nicht abgeschwächt oder aufgehoben. In einer ersten Versuchsreihe injizierten wir 1,4 mg/kg Nicotinbitartrat intravenös. Bei einer Gruppe von 10 Mäusen injizierten wir 12 min vorher 0,4 ml 0,9%iger NaCl-Lösung subcutan. Alle 10 Mäuse reagierten auf Nicotin mit einem koordinierten Lauf-Anfall, 6 Tiere nahmen Seitenlage ein, 1 Tier starb. 10 weitere Tiere erhielten 12 min vor Nicotin 1 mg/g SPG_{AC} (= 12 E/g SP) subcutan, alle 10 Tiere zeigten einen Lauf-Anfall, 7 Tiere nahmen Seitenlage ein. Nun verminderten wir die intravenöse Nicotindosis auf 0,7 mg/kg. Diese Dosis war so schwach, daß von 9 NaCl-Mäusen nur 6 Tiere mit einem Lauf-Anfall reagierten; kein Tier nahm Seitenlage ein. Von 5 Mäusen, die 12 min vorher 1 mg/g SPG_{AC} erhalten hatten, zeigten 3 einen Lauf-Anfall. SP beeinflußt also auch die zentralen Wirkungen von Nicotin nicht.

Auffallend stark antagonistisch wirkte jedoch gegenüber Strychnin (Tab. 9). Hier war die antagonistische Wirkung von SP noch weitaus stärker als gegen Pikrotoxin. Auch die Latenzzeit bis zum Auftreten der ersten neurotoxischen Strychnin-Wirkungen wurde durch SP mehr als verdoppelt. Wir glauben, daß dieses Beispiel deutlich zeigt, daß die Beobachtung solcher Latenzzeiten wichtig ist, und daß man aus einer Verlängerung dieser Zeitspanne auf eine verminderte Wirksamkeit eines

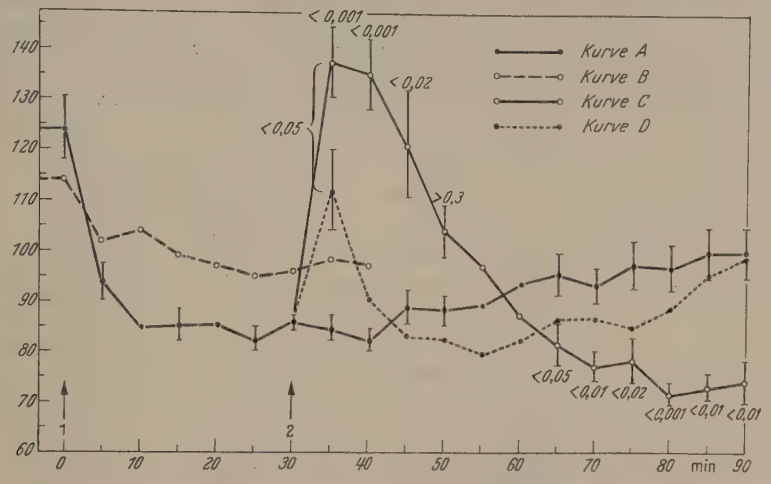


Abb. 2. Verhalten der Atemfrequenz des Meerschweinchens nach subcutaner Injektion von 15 mg/kg Morphinsulfat (Kurve *A*; n = 5) und von 1 mg/g SPGAc = 12 E/g (Kurve *B*; n = 2). Beeinflussung der Morphin-Wirkung auf die Atemfrequenz durch die subcutane Injektion von 1 mg/g SPGAc = 12 E/g (Kurve *C*; n = 5) und von 1 mg/g PF_1 = 0,18 E/g (Kurve *D*; n = 5). Pfeil Nr. 1: Injektion von Morphin bzw. von SPGAc; Pfeil Nr. 2: Injektion von SPGAc bzw. von PF_1. Abszisse: Zeit in Minuten, Ordinate: Anzahl der Atemzüge pro Minuten. Eingezeichnet sind die mittleren Fehler der Mittelwerte sowie die p-Werte für den Vergleich zwischen Kurve *A* und Kurve *C*

auf das ZNS wirkenden Pharmakons schließen kann, wie wir es bei Pikrotoxin getan haben; Voraussetzung ist natürlich, daß die Resorptionsbedingungen gleich geblieben sind.

Als wir beobachtet hatten, daß SP die erregende Wirkung von Morphin auf das ZNS der Maus vermindert, interessierte uns die Frage, ob SP etwa auch die depressive Wirkung von Morphin auf das Atemzentrum antagonistisch beeinflussen kann. Diese Versuche machten wir an männlichen Meerschweinchen im Gewicht von 160—180 g, bei denen wir die Atemfrequenz registrierten (Abb. 2). Eine Gabe von 15 mg/kg Morphinsulfat subcutan verminderte die Atemfrequenz mehr als 90 min lang. Das SP-freie Präparat PF_1 verursachte nur eine kurzdauernde, aber echte Zunahme der durch Morphin erniedrigten Atemfrequenz ($p < 0{,}01$) was zum großen Teil wohl auf die Erregung der Tiere bei der Injektion, zum kleinen Teil jedoch vielleicht auf eine geringfügige SP-Wirksamkeit

zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz zu PF_1 zeigte SPG_{AC} einen klaren Morphin-Antagonismus: Die Atemfrequenz war schon 5 min nach der Injektion des Präparates wieder normal und sank von der 10. min langsam auf das Morphin-Niveau ab. Sehr auffallend, jedoch ganz unzweideutig ist die erhebliche Verstärkung der Morphin-Wirkung durch das Präparat SPG_{AC} nach dem Abklingen seines Morphin-antagonistischen Effektes. Schwach angedeutet zeigt sich dies auch bei dem

Tabelle 10. *Verhalten der Sensibilität des elektrisch gereizten Mäuseschwanzes.* Die Substanzen wurden 30—40 min vor der Messung der Reizschwelle gleichzeitig subcutan an getrennten Orten injiziert. ε ist der mittlere Fehler der mittleren Differenz. Die Versuche Nr. 1—11 wurden mit dem Kollektiv A, Nr. 12—14 mit dem Kollektiv B vorgenommen

Nr.	Datum	subcutan injizierte Substanzen	Mittlere Differenz der Reizstromstärke in Milliamp.	$\pm \varepsilon$ intra-individuell	p
1	28. X.	PF_2 1 mg/g = 0,3 E/g	+ 0,011	0,0272	> 0,6
2	31. X.	SPG 1 mg/g = 8,5 E/g	— 0,122	0,0345	< 0,01
3	2. XI.	Morphin 3 mg/kg 0,4 ml NaCl-Lösung	+ 0,29	0,07	< 0,01
4	4. XI.	Morphin 3 mg/kg SPG 1 mg/g	— 0,039	0,0454	> 0,4
5	7. XI.	Morphin 3 mg/kg SPG 1 mg/g (Chymotrypsin-inaktiviert)	+ 0,162	0,0356	< 0,01
6	12. XI.	Morphin 3 mg/kg PF_1 1 mg/g	+ 0,206	0,0242	< 0,001
7	14. XI.	Morphin 3 mg/kg 0,4 ml NaCl-Lösung	+ 0,203	0,036	< 0,001
8	15. XI.	SPD 1 mg/g = 16,5 E/g	— 0,14	0,0432	< 0,02
9	19. XI	Morphin 3 mg/kg SPD 1 mg/g	+ 0,23	0,0756	< 0,02
10	22. XI.	Morphin 3 mg/kg SPG 1 mg/g	+ 0,23	0,0566	< 0,01
11	24. XI.	SPG 1 mg/g = 16,5 E/g	+ 0,05	0,047	> 0,3
12	1. XII.	Morphin 3 mg/kg PF_1 1 mg/g	+ 0,256	0,076	< 0,01
13	2. XII.	Morphin 3 mg/kg SPG 1 mg/g	— 0,12	0,058	> 0,05
14	3. XII.	Morphin 3 mg/kg SPD 1 mg/g	— 0,089	0,0303	< 0,02

SP-freien Präparat, was vielleicht ebenfalls auf die geringe Verunreinigung mit SP zurückzuführen ist. Solche synergistischen Nachwirkungen wurden bei den synthetischen Morphin-Antagonisten am Atemzentrum nicht beobachtet (MALORNY, 1956).

Auf das normale Atemzentrum wirkte SP keineswegs erregend, sondern eher depressiv. Leider konnten wir wegen des Mangels an SP nur 2 Versuche in dieser Richtung unternehmen. Da aber die beiden Versuche völlig identisch verliefen, halten wir die entsprechende Kurve der Abb. 2 für vertrauenswürdig. Besonders auffallend war bei diesen Versuchen am Meerschweinchen, daß die Tiere *sofort* nach der subcutanen

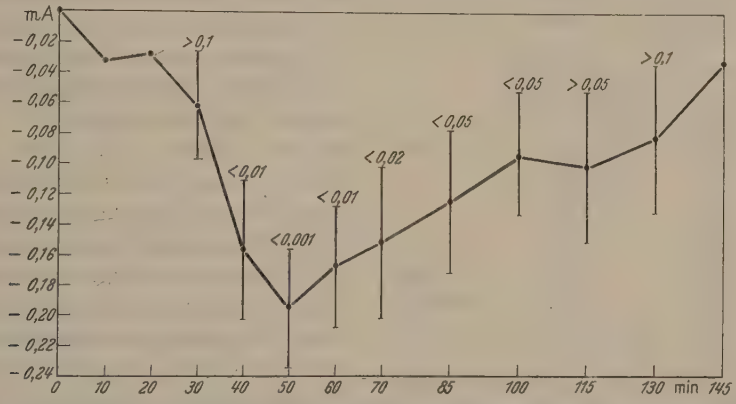


Abb. 3. Erniedrigung der Schmerzschwelle nach subcutaner Injektion von 1 mg/g SPG = 8,5 E/g bei 10 Mäusen. Jeder Punkt ist die mittlere Differenz zum Normalwert, eingezeichnet sind die mittleren intra-individuellen Fehler der mittleren Differenzen; die eingetragenen Zahlen sind die zugehörigen p-Werte. Abszisse: Zeit seit der Injektion in Minuten, Ordinate: Differenz der Reizstromstärke in Milliampere

SP-Injektion unruhig wurden und zuckten. Dies dauerte bei den Morphin-Tieren 5—7 min lang. Bei Tieren, die kein Morphin erhalten hatten, war dieses Phänomen wesentlich stärker ausgeprägt. Hierbei dauerte dieser Zustand 20—30 min, so daß in diesen Fällen die Atmung nicht wie sonst mit dem Hebel registriert werden konnte, sondern mit der Stoppuhr gezählt werden mußte. Nach PF_1 waren diese Erscheinungen nur ganz schwach angedeutet. Bei etwa 30% der Mäuse sahen wir übrigens ebenfalls *sofort* nach subcutaner Injektion von SP ähnliche, aber rasch vorübergehende Erscheinungen, besonders Kratzen an der Stelle der Injektion. Wir hatten den Eindruck, daß diese Effekte von SP durch lokale Erzeugung von Schmerz oder Juckreiz hervorgerufen wurden. Möglicherweise wird durch SP Histamin in Freiheit gesetzt, was die besondere starke Reaktion der Meerschweinchen erklären würde; diese Tiere sind bekanntlich für Histamin viel empfindlicher als Mäuse.

Die Morphin-antagonistischen Wirkungen von SP, die wir bisher beobachtet hatten, regten uns zur Prüfung der Frage an, ob SP etwa auch die analgetische Wirksamkeit von Morphinsulfat vermindert oder aufhebt (Tab. 10). Zunächst untersuchten wir die Wirkung unserer Präparate auf die Schmerzschwelle. Überraschenderweise senkte SPG die Schmerzschwelle, während das SP-freie Präparat PF_1 wirkungslos blieb (Versuch Nr. 1 und 2). Abb. 3 zeigt diesen SP-Effekt in Form einer Zeit-Wirkungskurve, bei der die relativ lange Dauer der Hyperalgesie auffällt. Wie bei der analgetischen Wirkung von Morphin dauert es auch bei der hyperalgetischen Wirkung von SP etwa 40—50 min, bis der maximale Effekt eintritt. In den Versuchen Nr. 3—8 ergab sich, daß SP aus Gehirn (Nr. 4 und 13) ebenso wie aus Darm (Nr. 14) die analgetische Wirkung von Morphin völlig unterdrückt und darüber hinaus die Schmerzschwelle trotz Morphin noch erniedrigt. Diese Hyperalgesie trotz der Morphin-Behandlung war nur bei dem SP-Präparat aus Darm signifikant (Nr. 14), das somit wirksamer war als das Präparat aus Gehirn. Nicht Morphin-antagonistisch wirkten das SP-freie Präparat (Nr. 6 und 12) und das durch Chymotrypsin inaktivierte SP-Präparat SPG (Nr. 5). Auch dieser Morphin-Antagonismus ist also eine Eigenschaft des unversehrten Polypeptid-Moleküls von SP. Aus Abb. 4 geht hervor, daß auch die bereits vorhandene Morphin-Analgesie von SP durchbrochen werden kann. Auch hier zeigt sich angedeutet wie in Abb. 2 eine leichte Verstärkung der Morphin-Wirkung nach dem Abklingen der antagonistischen Wirkung von SP.

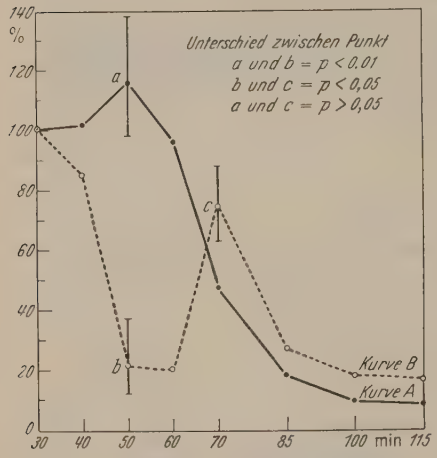


Abb. 4. Änderung des analgetischen Morphin-Effektes (Kurve *A*) auf die Schmerzschwelle durch 1 mg/g SPG = 8,5 E/g (30 min nach Morphin subcutan injiziert; Kurve *B*). Die beiden Kurven sind Mittelwerte aus je 10 Mäusen. Die 30 min nach der Morphin-Injektion erreichte Änderung der Schmerzschwelle wurde gleich 100 gesetzt (siehe Methodik!). Eingezeichnet ist der mittlere Fehler des Mittelwertes. Abszisse: Seit der Morphin-Injektion vergangene Zeit in Minuten, Ordinate: Morphin-Effekt in Prozent des 30 sec-Wertes

In den letzten 3 Versuchen, die wir mit Mäusekollektiv A durchführten (Nr. 9, 10 und 11), reagierten die Tiere nicht mehr wie vorher auf SP: Weder SP aus Darm noch SP aus dem Gehirn konnte die analgetische Wirksamkeit von Morphin auch nur im geringsten abschwächen, ferner zeigte sich auch keine Erniedrigung der Reizschwelle nach SP mehr. Wir vermuteten, daß die Mäuse gegen SP resistent geworden waren. Wir

glauben, daß diese Ansicht richtig ist, da bei den frischen Mäusen des Kollektivs B die beiden SP-Präparate die analgetische Wirksamkeit von Morphin wieder so aufhoben, wie wir es schon bei Kollektiv A beobachtet hatten.

Die gegen SP restistent gewordenen Mäuse des Kollektivs A wurden am 25. XI. getötet und die Gehirne zu Trockenpulver verarbeitet. Wir wollten untersuchen, ob die Gehirne der gegen SP resistent gewordenen Mäuse mehr SP zerstören können als normale Gehirne. Seit GULLBRING (1943) wissen wir, daß im Gehirn ein thermolabiles Ferment vorhanden ist, das SP zerstört. Wie die Tab. 11 zeigt, ist die Aktivität oder die Konzentration dieses Ferments im Gehirn der gegen SP resistenten Mäuse tatsächlich vermehrt. Das frische Mäusegehirn wiegt im Mittel 487 mg, das getrocknete Gehirn 68 mg. Unter unseren Bedingungen zerstörte das Gehirn der normalen Maus demnach pro Stunde etwa 29 E SP, das Gehirn einer gegen SP resistenten Maus etwa 44 E SP. Bei den Mäusen des Kollektivs A war also eine echte erworbene Resistenz gegen SP entstanden, die ihren Grund in einer gesteigerten enzymatischen Zerstörung dieses Polypeptids hatte.

Tabelle 11. *Aktivität oder Konzentration des SP-zerstörenden Ferments im Gehirn der weißen Maus, ausgedrückt als die von dem Fermentextrakt aus 1 g Trockengehirn in 1 Std zerstörte Anzahl von SP-Einheiten*

	normale Mäuse E/g/Std	gegen SP resistente Mäuse E/g/Std
	468	633
	546	575
	352	585
	414	599
	283	650
	400	727
	375	643
	454	748
	567	625
Mittelwert:	426,6	642,4
Mittlere Fehler des Mittelwertes:	398,1—457,1	618,1—667,6
p	$< 0{,}001$	

Diskussion

Aus unseren Versuchen geht hervor, daß SP die Funktion des ZNS beeinflussen kann. Drei charakteristische Wirkungen haben sich dabei ergeben: 1. ein depressiver oder sedativer, 2. ein hyperalgetischer und 3. ein Morphin-antagonistischer Effekt. Wir möchten deshalb die beruhigenden Wirkungen, die VON EULER u. PERNOW (1954) nach intraventrikulärer Gabe von SP bei Katzen und Kaninchen sahen, spezifische SP-Wirkungen nennen; die übrigen dabei beobachteten Erscheinungen, wie Änderungen des Blutdrucks, der Atmung, Lecken und Schluckbewegungen sind sehr wahrscheinlich unspezifischer Natur, da sie von

Feldberg u. Sherwood (1954a) auch nach Histamin, 5-Oxytryptamin, ATP, Hexa- und Dekamethonium, Acetylcholin, Atropin, Adrenalin und d-Tubocurarin gefunden wurden.

SP aus Darm war in unseren Versuchen am ZNS ebenso wirksam wie SP aus Gehirn. Nach Umrath (1953) zerstört der von ihm hergestellte Fermentextrakt aus Gehirn SP aus sensiblen Nerven wesentlich schneller als SP aus Darm. Seiner Meinung nach sind SP aus Darm und SP aus Gehirn nicht identisch. Eliasson u. Pernow (zitiert n. Pernow 1955) fanden in biochemischen und biologischen Untersuchungen an isolierten Organen keinerlei Unterschied zwischen SP aus Gehirn und Darm. Auch unsere Ergebnisse sprechen nicht im Sinne von Umrath.

Bei einer Reihe unserer Versuche war SP aus Darm (16,5 E/mg) wesentlich stärker wirksam als SP aus Gehirn (8,5 E/mg). Wir schließen daraus, daß die typische SP-Aktivität unserer Präparate der entscheidende und quantitativ limitierende Faktor für die beobachteten zentralen Wirkungen ist. Dafür spricht auch die Wirkungslosigkeit der mit Chymotrypsin inaktivierten Präparate sowie unserer quasi SP-freien Kontroll-Präparate (PF_1 und PF_2). Die Dosierung unserer Präparate ist also nicht nach den verabreichten Gewichtsmengen, sondern nach den injizierten SP-Einheiten zu beurteilen. Bei einer Dosierung von etwa 9 E/g oder 9000 E/kg sahen wir deutliche Effekte. Das bisher reinste SP-Präparat hat Pernow (1953) hergestellt; es enthielt 2000—3000 E/mg. Von einem SP-Präparat mit einer Aktivität von 3000 E/mg hätten wir nur 3 mg/kg benötigt. Falls sich diese Vermutung bei einer Nachprüfung bestätigen sollte, würde man SP zu den Substanzen zu rechnen haben, die eine starke Wirkung auf das ZNS ausüben.

Eine Analyse der zentralen Wirkungen von SP auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse ist schwierig, da wir über die Wirkungsmechanismen der angewandten Pharmaka kaum etwas wissen. Zunächst ist ein depressiver Einfluß auf das ZNS unbestreitbar, der sich ausdrückt in einer sedativen Wirkung auf das unvorbehandelte Tier, in einer Verlängerung der Schlafdauer nach Evipan sowie in einer Verminderung der psychomotorischen Stimulierung durch Morphin und Pervitin und in einem Antagonismus gegenüber Harmin, Strychnin und Pikrotoxin. Aber schon der Synergismus mit Bulbocapnin ist rätselhaft, wenn auch angesichts des Harmin-Antagonismus von Bulbocapnin und SP einleuchtend ist. Nach Spiegel (1938) ist die Bulbocapnin-Akinese und -Katatonie „a state of inhibition produced by weak stimulation"; die Reaktionsfähigkeit der Hirnrinde und verschiedener subcorticaler Areale wie Kleinhirnrinde, Reticulärsubstanz des Mittelhirns und Hypothalamus ist während der experimentellen Bulbocapnin-Katalepsie erhalten, eventuell sogar gesteigert, wie an Hand des Einstromes afferenter

Impulse nachgewiesen werden konnte (Szekely u. Spiegel, 1954). In hohen Dosen erzeugt Bulbocapnin sogar tonische und klonische Konvulsionen.

Es ist sehr auffallend, daß SP zwar gegen Pikrotoxin und Strychnin, nicht aber gegen Cardiazol und Elektroschock wirkt. Damit deutet sich eine Sonderstellung und eine Verwandtschaft der Elektroschock- und Cardiazol-Konvulsionen an. Hier ist darauf hinzuweisen, daß die Wirkungen von Elektroschock und Cardiazol offenbar eng mit dem Natrium-Stoffwechsel der Ganglienzellen verknüpft sind (Swinyard, Schiffman u. Goodman, 1955). Hierher gehört auch die Beobachtung von Swinyard u. Cole, zitiert n. Swinyard, Schiffman u. Goodman, 1955), wonach die Elektroschock-Schwelle von Mäusen nach einer subkonvulsiven Dosis von Cardiazol erniedrigt war, während dies nach Strychnin und Pikrotoxin nicht der Fall war. Das Versagen von SP gegenüber Nicotin-Konvulsionen dürfte nicht von großer Bedeutung sein; die zentrale Wirksamkeit von Strychnin wird besonders durch Sympathicolytica stark vermindert (Laurence u. Stacey, 1953) und soll in erster Linie eine vasculäre Grundlage haben.

Lysergsäurediäthylamid (LSD) konnte die Evipan-potenzierende Wirkung von SP abschwächen. Das erinnert an die Versuche von Shore, Silver u. Brodie (1955a, b), wonach LSD die Evipan-potenzierende Wirksamkeit von Reserpin und Serotonin bei Mäusen vermindert. Es ist jedoch fraglich, ob wir wie die obigen Autoren daraus schließen dürfen, SP wirke ebenso wie Reserpin auf dem Umwege über die Freisetzung von Serotonin. Im Gegensatz zu SP wirkt nämlich Reserpin nicht gegen Strychnin, Pikrotoxin und Pervitin (Tripod, Bein u. Meier, 1955). Aber vielleicht liegen doch gewisse Beziehungen der SP-Wirkung zum Serotonin-Stoffwechsel des Gehirns vor, da Harmin ein Serotonin-Antagonist ist (Shaw u. Woolley, 1953); es ist jedoch nicht bekannt, ob die Tremorerzeugende Aktivität von Harmin auf dieser Eigenschaft des Alkaloids beruht.

Kann man SP als echten Morphin-Antagonisten bezeichnen? In Dosen, die Morphin-antagonistisch wirken, hat SP wesentlich stärkere Eigenwirkungen auf das ZNS als die synthetischen Morphin-Antagonisten, so daß der Morphin-Antagonismus in diesem Falle unspezifisch sein könnte. Das mag für die antagonistische Wirkung von SP gegenüber der Morphin-Erregung der Maus gelten, da SP auch gegen die Pervitin-Erregung wirksam ist. Die synthetischen Morphin-Antagonisten vermindern die Pervitin-Erregung der Maus jedoch nicht (Malorny, 1955b). Auch die Aufhebung der Morphin-Analgesie durch SP beruht nicht auf einem Wirkungsmechanismus, der dem der synthetischen Morphin-Antagonisten entspricht. Die synthetischen Antagonisten erniedrigen die Schmerzschwelle keineswegs, sondern wirken in höherer Dosierung

selbst schwach analgetisch (Unna, 1943; Malorny, 1955a; Wirth, 1955). Ob SP auch die analgetische Wirkung anderer Analgetica verhindert, konnten wir bisher nicht untersuchen. Auch bei der Durchbrechung der Morphin-Wirkung auf das Atemzentrum hat SP wahrscheinlich einen anderen Wirkungsmechanismus als die synthetischen Morphin-Antagonisten, die ihrerseits das Atemzentrum schon normalerweise zu erregen scheinen (Unna, 1943; Vivante, Kao u. Belford, 1954). Im Gegensatz zu den synthetischen Morphin-Antagonisten hat SP eine leichte depressive Wirkung auf das normale Atemzentrum, die sich schon bei der Morphin-antagonistischen Dosis andeutet. Letztere Autoren halten die Morphin-antagonistische Wirkung von Nalorphine am Atemzentrum für unspezifisch, da auch die Pentobarbital-Atemdepression durch dieses Pharmakon beseitigt wird. Sehr auffallend und nicht zu erklären ist die echte Verstärkung der Morphin-Atemdepression, die nach dem Abklingen des Morphin-antagonistischen SP-Effektes eintritt. Dies wird bei den synthetischen Morphin-Antagonisten nicht beobachtet (Malorny, 1956).

Man kann SP also nur mit Vorbehalt als Morphin-Antagonisten nach der heutigen Auffassung bezeichnen. Das physiologische Vorhandensein einer gegen Morphin wirkenden Substanz im ZNS ist allerdings von großem theoretischen Interesse im Hinblick auf die Entstehung der Morphin-Toleranz; der Mechanismus der Morphin-Gewöhnung ist ja noch nicht geklärt. Seevers u. Woods (1953) wiesen darauf hin, daß das Ausmaß der Morphin-Entgiftung im an Morphin gewöhnten Organismus bei weitem nicht ausreicht, um die Morphin-Toleranz zu erklären und schreiben: „It is conceivable that a new metabolic product formed at or near the site of cellular action might compete for the receptors ordinarily utilized by morphine." Die Autoren meinten mit diesem Stoffwechselprodukt ein vom Organismus gebildetes Morphin-Derivat und dachten an das „Pseudomorphin" oder „Oxydimorphin" von Marmé (1883), das im an Morphin gewöhnten Organismus entstehen und Morphin-antagonistisch wirken soll. Wir glauben, daß die physiologische Existenz eines „natürlichen Morphin-Antagonisten" ähnliche Überlegungen befruchten könnte, und daß es sinnvoll wäre zu untersuchen, ob Beziehungen zwischen dem SP-Stoffwechsel des ZNS und der Morphin-Gewöhnung bestehen.

Die nach SP eintretende Hyperalgesie sowie die Verhinderung und Durchbrechung der analgetischen Wirkung von Morphin durch SP erinnern an die Befunde von Amsler (1921: Narkotische Dosen von Chloralhydrat durchbrechen oder verhindern die Morphin-Analgesie) und Silver (1930: Subnarkotische Dosen von Pernocton sowie subnarkotische und narkotische Dosen weiterer Schlafmittel erzeugen Hyperalgesie, die durch Morphin aufgehoben werden kann, Pernocton durchbricht die Morphin-Analgesie). Die Auffassung Starkensteins (1932; 1938) von der Wirkung der Analgetica auf Sherringtons Pseudoschmerzreflexe, die man im Tierversuch nach Schmerzreizen bekanntlich ausschließlich beobachtet, gründet sich auf die Versuchsergebnisse obiger Autoren; danach soll Morphin corticale Hemmungen erregen, die von den Schlafmitteln beseitigt werden. Die erwähnten älteren Befunde werden ergänzt durch die neue Beobachtung von Friebel u. Reichle (1955), daß Luminal und Evipan die analgetische Wirksamkeit von Morphin vermindern. Es ist natürlich nicht unmöglich, daß die hyperalgetische Wirkung von SP auf einem ähnlichen Wirkungsmechanismus beruht. Allerdings haben wir eher den

Eindruck, daß SP die Funktion hemmender Systeme nachahmt oder verstärkt. Unsere Versuchsergebnisse reichen nicht aus, um die Entstehung der Hyperalgesie nach SP zu erklären, zumal da nach der Hypothese von LEMBECK (1953) SP die synaptische Überträgersubstanz des ersten sensiblen Neurons sein soll. Sollte man nicht nach der Injektion einer sensiblen Überträgersubstanz Hyperalgesie erwarten? Wie dem auch sei, das normale Vorkommen von SP im ZNS dürfte für den Wirkungsmechanismus der Analgetica von Bedeutung sein.

Bei den modernen Ansichten über den Vorgang der synaptischen Reizübertragung im ZNS spielt die Annahme von Überträger- oder Transmitter-Substanzen eine große Rolle; hierüber geben die Übersichtsarbeiten von FELDBERG (1952/53) und FATT (1954) sowie der Bericht über das „Symposium on neurohumoral transmission" in Philadelphia[1] einen Überblick. So nimmt man allein für die Synapsen im Rückenmark eine erregende und eine hemmende Überträgersubstanz an den Synapsen der Motoneurone an, eine weitere Überträgersubstanz — nämlich Acetylcholin — an den Synapsen gewisser Zwischenneurone und schließlich SP als Überträgersubstanz des ersten sensorischen Neurons (LEMBECK, 1953; AMIN, CRAWFORD u. GADDUM, 1954). FATT (1954) hält es wegen der unterschiedlichen Wirkung verschiedener Pharmaka für möglich, daß in anderen Teilen des ZNS noch weitere und andere Überträgersubstanzen vorkommen. Pharmakologisch wichtig ist die moderne Deutung der Strychnin-Wirkung auf das ZNS, die nicht nur auf obigen Vorstellungen beruht, sondern umgekehrt auch diese Vorstellungen stützt: Nach den subtilen Versuchen von BRADLEY, EASTON u. ECCLES(1953) sowie ECCLES, FATT u. KOKETSU (1954) vermindert Strychnin in niedriger Dosierung die Wirksamkeit hemmender Impulse auf die motorische Vorderhorn-Ganglienzelle, ohne die synaptische Übertragung erregender Reize auf diese Ganglienzelle zu verändern; zugleich werden auch die durch einen hemmenden Reiz ausgelösten und für ihn typischen Membran-Eigenschaften der Ganglienzelle abgeschwächt. Die Autoren erklären diesen Strychnin-Effekt in Analogie zu der bekannten Wirkung von Curare an der motorischen Endplatte mit einer kompetitiven Verdrängung der hemmenden Erregungssubstanz von Receptor an der Membran der motorischen Ganglienzelle, wo deshalb nun die erregende Überträgersubstanz überwiegt. Andererseits müßte die von außen zugeführte hemmende Überträgersubstanz als kompetitiver Antagonist gegenüber Strychnin wirken.

SP wirkte in unseren Versuchen in der Tat gegen Strychnin. Der Antagonimus von SP gegenüber Strychnin war sogar sehr stark ausgeprägt, was besonders bemerkenswert ist wegen der schwachen Wirksamkeit von SP gegen Pikrotoxin und des fehlenden Antagonismus gegenüber Cardiazol und Elektroschock. Da wir früher gefunden hatten (ZETLER u. SCHLOSSER, 1955), daß die SP-Konzentration in dem hemmend wirkenden Suppressor-Areal Gyrus cinguli anterior doppelt so hoch ist wie im Gyrus praecentralis und Gyrus postcentralis, kann man sich fragen, ob SP nicht auch die Überträgersubstanz hemmender Neurone sein könnte.

FLOREY (1953; 1954) hat einen „nervösen Hemmungsfaktor" (Faktor I) aus Gehirn und Rückenmark hergestellt. FLOREY u. MCLENNAN (1955a, b) zeigten, daß Faktor I beim Kaninchen die Erregungsübertragung im unteren Mesenterialganglion blockiert, daß er nach subcutaner Injektion Mäuse vor der tödlichen Wirkung von Strychnin

[1] Pharmacol. Rev. 6, 3 (1954).

schützt und daß er bei lokaler Aufbringung auf das freipräparierte Rückenmark den monosynaptischen Streckreflex hemmt, den polysynaptischen Beugereflex jedoch verstärkt. Die Autoren glauben, daß im letzteren Falle die Zwischenneurone vielleicht für den Faktor I schwerer zu erreichen sind, und daß man nicht gleich annehmen müsse, daß die Hemmung des polysynaptischen Reflexes durch eine andere physiologische Überträgersubstanz vermittelt wird. — Dieser Faktor I ist bestimmt nicht identisch mit SP und enthält nach der Art seiner Herstellung auch keine SP als Verunreinigung. Es ist auch nicht möglich, daß unsere SP-Präparate die beschriebenen Wirkungen nur deshalb hervorriefen, weil sie mit Faktor I verunreinigt waren. Denn im Gegensatz zu SP ist Faktor I äußerst labil, er ist nur in saurer alkoholischer Lösung oder in gefrorener wäßriger Lösung stabil und wird in trockenem Zustand bei Zimmertemperatur an der Luft in wenigen Sekunden wirkungslos (Florey: Briefliche Mitteilung). Unsere SP-Präparate waren 3—6 Monate in trockenem Zustand bei Zimmertemperatur in normaler Atmosphäre aufbewahrt worden; auch eine etwaige Verunreinigung unserer Substanzen mit Faktor I wäre also bedeutungslos.

Angesichts des normalen Vorkommens und der charakteristischen Verteilung von SP im ZNS erhebt sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieses Polypeptids. Aus den dargelegten Versuchsergebnissen könnte man schließen, daß SP eine Überträgersubstanz nicht nur bei sensiblen Neuronen ist, wie schon Lembeck (1953) annahm, sondern auch bei den Neuronen hemmender Systeme Transmitter-Funktionen erfüllt. Es bereitet dem physiologischen und pharmakologischen Denken keine Schwierigkeiten, für SP eine solche doppelte Funktion anzunehmen. Bei der großen Bedeutung der zentralen Hemmung ist der Gedanke an mehr als eine hier wirksame Überträgersubstanz nicht störend; dieser Gedanke findet sich auch bei Fatt (1954).

Auch die erregende Wirkung von SP auf das durch Morphin beeinflußte Atemzentrum unterstützt auf indirekte Weise unsere Annahme einer inhibitorischen Funktion von SP, wenn man die Vorstellungen von Breckenridge u. Hoff (1952) verwertet. Diese Autoren fanden, daß Morphin dieselben Störungen der Atmung erzeugt wie eine Decerebrierung; sie glauben, daß Morphin in dieser Hinsicht eine „pharmakologische Decerebrierung" hervorruft durch Ausschaltung corticaler und subcorticaler Suppressor-Mechanismen, die die Tätigkeit der caudaler liegenden Respirationszentren modifizierten. Von außen zugeführte SP hätte demnach als Hemmungssubstanz die durch Morphin ausgeschalteten Hemmungsmechanismen ersetzt (oder vielleicht die hemmenden Systeme reaktiviert oder stimuliert).

Auch die beruhigende Wirkung von SP auf die durch Morphin erregte Maus möchten wir auf diese Weise erklären. Starkenstein (1924),

Tatum, Seevers u. Collins (1929) sowie Malorny (1955b) glauben, daß die erregende Wirkung von Morphin durch eine Lähmung hemmender Mechanismen zustande kommt.

Zusammenfassung

Substanz P (SP) wurde aus Rinder-Gehirn und Pferde-Duodenum hergestellt. SP hatte bei der subcutanen Injektion in der Dosis von 8—16 E/g folgende Wirkungen auf das Zentralnervensystem:

1. SP wirkte auf normale Mäuse sedativ.

2. SP wirkte bei Mäusen antagonistisch gegenüber den zentral erregenden Wirkungen von Harmin, Strychnin, Pikrotoxin, Pervitin und Morphin.

3. SP verstärkte bei Mäusen die zentralen Effekte von Evipan und Bulbocapnin. Lysergsäurediäthylamid verminderte die Evipan-potenzierende Wirkung von SP.

4. SP beeinflußte bei Mäusen nicht den Elektroschock sowie die zentralerregenden Wirkungen von Cardiazol und Nicotin.

5. SP erzeugte bei Mäusen eine Hyperalgesie (Senkung der Schmerzschwelle bei elektrischer Reizung des Schwanzes), die etwa 120 min lang andauerte.

6. SP verhinderte und durchbrach die Morphin-Analgesie bei Mäusen.

7. SP unterbrach bei Meerschweinchen die lähmende Wirkung von Morphin auf das Atemzentrum.

8. Diese Wirkungen hatte weder ein SP-freies Kontroll-Protein aus Gehirn noch SP nach Inaktivierung durch Chymotrypsin. Es handelt sich also um typische Wirkungen des unversehrten SP-Moleküls.

9. Es fand sich kein Unterschied zwischen SP aus Gehirn und SP aus Darm.

10. Nach häufiger SP-Injektion wurden die Mäuse gegen SP resistent. Das Gehirn der resistenten Mäuse zerstörte mehr SP (642 E/g Trockengewicht/Std) als das Gehirn normaler Mäuse (427 E/g/Std).

Aus der Analyse dieser Versuchsergebnisse haben wir den Schluß gezogen, daß SP im Zentralnervensystem eine physiologische Rolle als Überträgersubstanz hemmender und sensibler Neurone spielen könnte. Ferner könnte der SP-Stoffwechsel des Zentralnervensystems von Bedeutung sein für die Wirkung der Analgetica, für die Entstehung der Morphin-Gewöhnung sowie für die zentralen Effekte einer Reihe weiterer Pharmaka.

Herrn Doz. Dr. R. Hotovy, Darmstadt, danke ich für die freundliche Überlassung von Harmin und Bulbocapnin, Herrn Dr. A. Cerletti, Basel, für Lysergsäurediäthylamid, der Firma Bayer, Leverkusen, für Evipannatrium und der Firma Knoll, Ludwigshafen, für Cardiazol. Besonders dankbar bin ich Herrn Dr. F. K. Ohnesorge für seine hilfreiche Assistenz bei den Analgesie- und Elektroschock-Versuchen.

Literatur

Amin, A. H., T. B. B. Crawford and J. H. Gaddum: J. of Physiol. **126**, 596 (1954). — Amsler, C.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **90**, 257 (1921). — Behrens, M., u. G. Seydl: Arzneimittelforsch. **1**, 228 (1951). — Bleuler, M.: Lehrbuch der Psychiatrie, 1943, S. 21. — Bradley, K., D. M. Easton and J. C. Eccles: J. of Physiol. **122**, 474 (1953). — Breckenridge, C. G., and H. E. Hoff: J. of Neurophysiol. **15**, 57 (1952). — Brock, N., D. Lorenz u. H. Veigel: Arzneimittelforsch. **4**, 262 (1954). — Brown, W. C., D. O. Schiffman, E. A. Swinyard and L. S. Goodman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **107**, 273 (1953). — Dunér, H., U. S. von Euler und B. Pernow: Acta physiol. scand. (Stockh.) **31**, 113 (1954). — Eccles, J. C., P. Fatt and K. Koketsu: J. of Physiol. **126**, 524 (1954). — Fatt, P.: Physiologic. Rev. **34**, 674 (1954). — Feldberg, W.: Proc. Roy. Soc., Lond. Ser. B **140**, 199 (1952/53). — Feldberg, W., and S. L. Sherwood: J. of Physiol. **123**, 148 (1954a); **125**, 488 (1954b). — Feldberg, W., and C. C. Toh: J. of Physiol. **119**, 352 (1953). — Feldberg, W., and M. Vogt: J. of Physiol. **107**, 372 (1948). — Florey, E.: Naturwissenschaften **40**, 295 (1953); Arch. internat. Physiol. **62**, 33 (1954). — Florey, E., and H. McLennan: J. of Physiol. **129**, 384 (1955a); **130**, 446 (1955b). — Friebel, H., u. C. Reichle: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 551 (1955). — Gaddum, J. H.: J. Pharm. Pharmacol. **5**, 345 (1953). — Goodman, L. S., and A. Gilman: The pharmacological basis of therapeutics. New York 1955. — Gullbring, B.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **6**, 246 (1943). — Hara, S.: Jap. J. Pharmacol. **2**, 127 (1953). — Hara, S., and K. Kawamori: Jap. J. Pharmacol. **3**, 149 (1954). — Hellauer, H. F., u. K. Umrath: Pflügers Arch. **249**, 619 (1948a); **250**, 737 (1948b). — Jefferson, G.: Brit. Med. Bull. **6**, 333 (1950). — Kopera, H., u. W. Lazarini: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 214 (1953). — Laurence, D. R., and R. S. Stacey: Brit. J. Pharmacol. **8**, 62 (1953). — Lembeck, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **219**, 197 (1953). — Marmé, W.: Dtsch. med. Wschr. **1883**, 33. — Malorny, G.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 82 (1953a); Arzneimittelforsch. **5**, 252 (1955b); im Druck (1956). — Pernow, B.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **29**, Suppl. 105 (1953); Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **7**, 59 (1955). — Pletscher, A., P. A. Shore and B. B. Brodie: Science (Lancaster, Pa.) **122**, 374 (1955). — Pulewka, P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **211**, 278 (1950). — Seevers, M. H., and L. A. Woods: Amer. J. Med. **14**, 546 (1953). — Shaw, E., and D. W. Woolley: J. of Biol. Chem. **203**, 979 (1953). — Shore, P. A., S. L. Silver and B. B. Brodie: Experientia (Basel) **11**, 272 (1955); Science (Lancaster, Pa.) **122**, 284 (1955). — Silver, S.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **158**, 219 (1930). — Spiegel, E.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **63**, 438 (1938). — Starkenstein, E.: Heffter's Handb. exper. Pharmakol. **2/II**, 817 (1924); Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **165**, 325 (1932); Lehrbuch der Pharmalokogie, Toxikologie und Arzneiverordnung. Leipzig und Wien 1938. — Swinyard, E. A., D. O. Schiffman and L. S. Goodman: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **114**, 160 (1955). — Szekely, E. G., and E. A. Spiegel: Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **6**, 213 (1954). — Tatum, A. L., M. H. Seevers and K. H. J. Collins: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **36**, 447 (1929). — Tripod, J., H. J. Bein et R. Meier: Arch internat. Pharmacodynamie **96**, 406 (1955). — Umrath, K.: Pflügers Arch. **258**, 230 (1953). — Unna, K.: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **79**, 27 (1943). — Vivante, A., F. F. Kao and J. Belford: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **111**, 436 (1954). — von Euler, U. S.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **4**, 373 (1942). — Westerman, G.: Diss. Kiel 1950. — Wirth, W.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 81 (1955). — Zetler, G., u. L. Schlosser: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 159 (1955).

Dozent Dr. G. Zetler, Kiel, Pharmakologisches Institut der Universität, Hospitalstr. 20

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 539—546 (1956)

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Humboldt-Universität Berlin und der Neurochirurgischen Klinik des Hufeland-Krankenhauses, Berlin-Buch

Untersuchungen zur Frage des Wirkungsmechanismus und eines gegenseitigen Antagonismus verschiedener Muskelrelaxantien

Von

GÜNTHER VOGEL und HANS-JÜRGEN STEINKE

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Februar 1956)

Aus früheren Befunden[25] am Kaltblütermuskel war auf einen verschiedenen Angriffspunkt von d-Tubocurarin (dTc), Dekamethonium (D) und Succinylcholin (S) geschlossen worden. Während hiernach dTc offensichtlich keine direkte Wirkung auf die Membran der Muskelfaser entfaltet, ist für D und S anzunehmen, daß bei entsprechender Dosierung ein Angriff auch an der Membran der Muskelfaser selbst erfolgt.

Nachdem diese Interpretation unserer Versuchsergebnisse auf der Analyse der Meßgrößen Verletzungspotential, Schwellenwert der Reizspannung und Chronaxie basierte, lag es nahe, ähnlicheUntersuchungen am gleichen Objekt durchzuführen, jetzt aber die *Mechanogramme* der gereizten Muskulatur zu analysieren und die *Geschwindigkeit der muskulären Erregungsleitung* zu bestimmen.

Die Versuchsreihen ergaben sich dabei aus Befunden, wonach die Zufuhr von Substanzen der „Pachycuraregruppe" (dTc und 1, 2, 3-Tri-(β-triäthylamino-äthoxy)-benzoltrijodid) eine Hemmung der neuromuskulären Erregungsübertragung durch eine „Stabilisierung" (Permeabilitätsminderung?) der Nervenendplatte (Npl.) verursacht[11, 12, 13], während es bei „Leptocurarestoffen" (D und S) zu einer Depolarisation zunächst der Endplatte[2, 6, 11, 12, 13, 15, 29, 30] dann aber auch der Muskelfaser selbst kommt[3, 4, 7, 8, 17, 18, 24].

Es kann deshalb erwartet werden, daß nach Anwendung von Pachycurare bei direkter Muskelreizung keine Änderung der muskulären Erregbarkeit auftritt und das Mechanogramm des curarisierten Muskels — abgesehen von evtl. möglichen Ermüdungseffekten — unverändert bleibt. Nach Zufuhr von Leptocurarestoffen müßte dagegen je nach Dosis mit Verminderung bzw. Erlöschen der direkten Erregbarkeit[25] und mit einer Verminderung bzw. Aufhebung der mechanischen Tätigkeit des Muskels gerechnet werden.

Diesbezügliche Untersuchungen wurden bereits von Jarcho u. Mitarb.[17, 18] am Rattenmuskel und von Ginzel, Klupp u. Werner[14] sowie von Zaimis[30] an der Katze durchgeführt.

Ferner kann erwartet werden, daß eine durch Pachycurare „stabilisierte" Membran durch Leptocurare soweit wieder aufgelockert wird, daß der neuromuskuläre Block verschwindet. Übereinstimmend damit hat Katz[19] bereits 1939 zeigen können, daß ein nicht vollständiger Curareblock durch kathodische Depolarisation der Npl-Gegend aufhebbar ist. — Unter Umständen müßte es auch möglich sein, daß eine unter Leptocurare „depolarisierte" Membran durch nachfolgende Gabe von Pachycurare wieder soweit „polarisiert" wird, daß eine Erregungsleitung und damit auch eine mechanische Tätigkeit des Muskels wiederhergestellt wird. Es überrascht daher auch nicht, daß die Wirkungen depolarisierender Stoffe, sogenannter „Katelektrotonica" (Fleckenstein) und im speziellen Fall der Leptocurarestoffe durch eine anodische Repolarisation neutralisierbar sind[4, 9, 10, 15] bzw. einen Kathodenblock verlängern und verstärken können[22, 23].

Indes sind die bisherigen Ergebnisse nicht eindeutig.

Während Paton u. Zaimis[24], Castillo, Phillips u. de Beer[5] MacFarlane, Unna u. Mitarb.[20] sowie Winter u. Lehmann[29] nur einen einseitigen Antagonismus — die Hemmung der Dekamethoniumwirkung durch vorinjiziertes dTc — beschrieben und eine antagonistische Wirkung von D auf die dTc-Blockade ablehnten, konnten Hutter u. Pascoe[16] in Versuchen am M. tibialis ant. der Katze zeigen, daß ein fast vollständiger Curareblock durch nachfolgende intraarterielle Injektion von 0,8—1,6 μg D im Mechanogramm aufhebbar ist. Aus diesem Versuch ist eine deutliche Dosenabhängigkeit der antagonistischen D-Wirkung — von maximaler Aufhebung des Curareblocks bis zum vollständigen Dekamethoniumblock — ersichtlich.

Von Malorny[21] wird schließlich bemerkt, daß auch die D-Lähmung namentlich im Stadium des Abklingens durch sehr kleine dTc-Dosen aufgehoben werden kann und ein wechselseitiger Antagonismus dTc-D besteht.

Schließlich ist eine Herabsetzung der muskulären Erregungsleitungsgeschwindigkeit nach Zufuhr von D und S zu erwarten, während von dTc als reinem Endplattenpharmakon keine entsprechende Wirkung angenommen werden kann.

Methodik

Die Versuche wurden an weiblichen Esculenten mit einem Durchschnittsgewicht von 50 g durchgeführt. Die Muskelreizung erfolgte so, daß der an seinem Ursprung in situ belassene durchblutete M. gastrocnemius verwendet wurde. Gereizt wurde mit maximalen Kondensatorentladungen über Silberelektroden, die Registrierung der Zuckung erfolgte in der üblichen Weise, Zufuhr der Muskelrelaxantien in die V. abdominalis.

Die Methodik zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Erregungsleitung des Muskels entspricht der für den Nerven mitgeteilten (Vogel u. Mitarb.[28]). Die Reizelektroden lagen im proximalen Drittel des M. sartorius von Rana escul., die Abgriffselektroden (bipolar) befanden sich am distalen (nervenfreien) Ende des Muskels. Zur Verwendung gelangten ausschließlich Rechteckimpulse.

Ergebnisse

1. Zunächst wurde das Mechanogramm bei direkter Einzelreizung des M. gastrocnemius von Rana esc. nach i.v.-Injektion von dTc*, 1,2,3-Tri-(β-triäthylamino-äthoxy) benzoltrijodid* (Pachycuraretyp) und Bis-Trimethylammonium-decandibromid (Dekamethonium)** (Leptocuraretyp) geprüft.

Da das dTc und das 1, 2, 3-Tri-(β-triäthylamino-äthoxy) benzoltrijodid einerseits, das Bis-cholinsuccinat-dichlorid und das Bis-Trimethylammonium-decandibromid andererseits untereinander muskelphysiologisch gleichartig wirken, werden von den vier zur Verwendung gekommenen Stoffen hier nur die Wirkungen des dTc als Vertreter des Pachycuraretyps und des Succinylcholins als Vertreter des Lepto curaretyps besprochen.

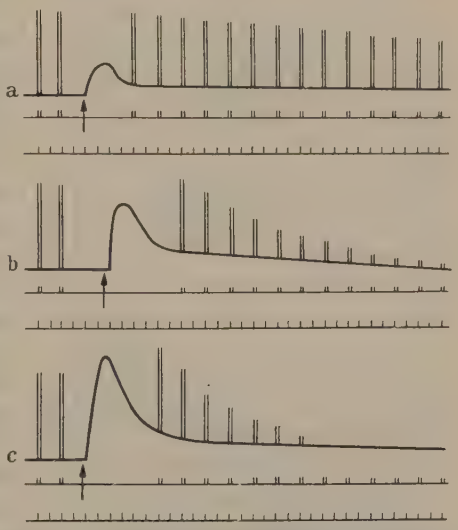


Abb. 1. Registrierung von oben nach unten: Mechanogramm des direkt gereizten Muskels, Reizmarkierung. Zeitschreibung in min. a) Bei ↑ Injektion von 0,25 mg Succinylcholin i.v. — b) Bei ↑ Injektion von 0,75 mg S i.v. — c) Bei ↑ Injektion von 1,25 mg S i.v.

Pachycuraretyp. Nach Injektion von 0,15 mg dTc war bei gleichbleibenden Kontraktionshöhen keine Beeinflussung des Muskelruhetonus zu registrieren. Erst nach 0,45 mg dTc konnten sowohl ein Nachlassen des Muskelruhetonus als auch eine Minderung der Kontraktionshöhen beobachtet werden, deren Ausmaß jedoch 10% des Ausgangswertes innerhalb 20-minütiger Versuchsdauer nach der Injektion nicht überschritt (Abb. 2). Die Anwendung von 1,5 mg dTc zeigte gegenüber der Wirkung von 0,45 mg in Bezug auf das Ausmaß der Tonussenkung und der Kontraktionshöhenminderung keine wesentliche Änderung.

Leptocuraretyp. Nach 0,25—2,5 mg Succinylcholin i.v. zeigte sich unmittelbar im Anschluß an die Injektion eine in Höhe und Zeitdauer dosenabhängige Kontraktur (Abb. 1a—c). Nach mehr als 1,0 mg überstieg die Höhe der Kontraktur die der Kontraktion des unvorbehandelten Muskels bei maximaler Reizung (Abb. 1c).

Die Zeit des Abklingens der Kontraktur stieg mit der Dosis an. Mit steigenden Dosen S wurden nach der Injektion die Kontraktionshöhen

* Die genannten Substanzen wurden uns dankenswerterweise von den Asta-Werken, Brackwede/Westf., zur Verfügung gestellt.

** Handelsbezeichnung „Decacuran", Dtsch. Hydrierwerke Rodleben bei Roßlau/Elbe.

zunehmend kleiner bis zur direkten Unerregbarkeit (Abb. 1b und c). Die Zeit von der Injektion bis zur Unerregbarkeit betrug im Durchschnitt bei 1,25 mg D 20 min, bei Injektion von 2,5 mg S 15 min.

2. Entsprechend den oben angestellten Überlegungen wurden steigende Dosen dTc (0,075—0,75 mg) i.v. injiziert und bei indirekter Unerregbarkeit S (1,25—2,5 mg) bzw. Dekamethonium (0,2—0,4 mg) nachinjiziert. Die Zeit zwischen beiden Injektionen schwankte je nach Erreichen des Wirkungsmaximums von dTc zwischen 10 und 20 min. Prinzipiell gleichen sich die Ergebnisse für S und D und zeigen folgende gemeinsame Veränderungen:

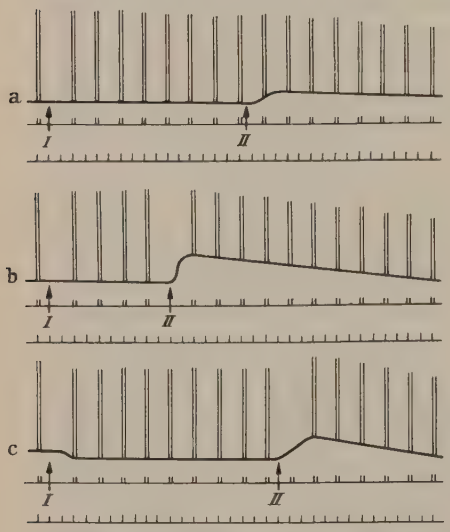


Abb. 2. Registrierung wie in Abb. 1. a) Bei ↑ I Injektion von 0,15 mg dTc i.v.; Bei ↑ II Injektion von 0,15 mg Dekamethonium i.v. — b) Bei ↑ I Injektion von 0,075 mg dTc i.v.; Bei ↑ II Injektion von 1,25 mg S i.v. — c) Bei ↑ I Injektion von 0,45 mg dTc i.v.; Bei ↑ II Injektion von 1,25 mg S i.v.

Die Ausbildung der typischen Kontraktur nach Injektion von S oder D wird durch vorinjiziertes dTc wesentlich beeinflußt. Die maximale Höhe der Kontraktur beträgt je nach dem gewählten Dosenverhältnis dTc-S bzw. dTc-D nur $^1/_4$ bis $^1/_5$ der Höhe bei alleiniger Leptocurareanwendung. Mit ansteigenden dTc-Dosen wird die Kontraktur zunehmend unterdrückt, bei steigenden S- und D-Dosen weniger stark beeinflußt (Abb. 2a und b). *Die Anstiegszeit der Kontraktur* (Steilheit des aufsteigenden Schenkels) ist bei vorinjiziertem dTc verlängert. Sie beträgt im Durchschnitt das Doppelte bis Dreifache (Abb. 2a—c). *Das Abklingen der Kontraktur* ist nach vorinjiziertem dTc ebenfalls deutlich in Zeit und Form verändert. Die Zeit bis zur völligen Erschlaffung ist wesentlich länger, der Muskel verharrt über längere Zeit in einem mäßig gesteigerten Ruhetonus (Abb. 2a und b). *Die Kontraktionshöhen*, die nach alleiniger S- und D-Gabe entscheidend gemindert wurden (Abb. 1a bis c), zeigen nach vorinjiziertem dTc nur einen begrenzten Abfall. Während im Kontrollversuch bei Injektion von 0,2 mg D nach 8 min ein Abfall von etwa 50% zu verzeichnen war, betrug dieser nach Vorinjektion von 0,5 mg dTc nur etwa 6% in der gleichen Zeit. Ein völliges Schwinden der direkten Erregbarkeit durch S und D wurde bei vorinjiziertem dTc nicht beobachtet (Abb. 2a—c).

Graduelle Unterschiede zwischen D und S ergaben sich durch die Größe der vorinjizierten dTc-Dosis, hinsichtlich der Anstiegszeit und der Zeit des Abklingens der Kontraktur. Der Kontraktionshöhenabfall nach S konnte im allgemeinen durch kleinere dTc-Dosen gemindert werden, als zur Erreichung des gleichen Effektes bei äquivalenter D-Gabe notwendig war (Abb. 2a und b). Die Anstiegszeit der Kontraktur war nach vorinjiziertem dTc bei D deutlicher verzögert als bei S. Erst bei einem sehr zugunsten des dTc gerichteten Dosenverhältnis konnte bei S eine ausgeprägte Verzögerung der Anstiegszeit bemerkt werden (Abb. 2c). Die Zeit des Kontrakturrückganges (Senkung des Kontrakturniveaus zur Grundlinie) erfolgte bei S deutlich schneller als bei D (Abb. 2b und c, im Vgl. zu 2a).

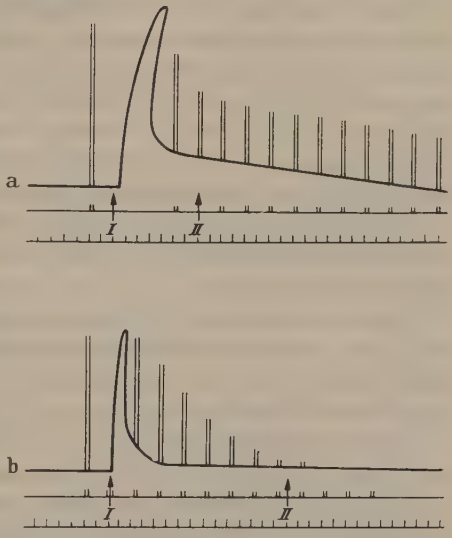


Abb. 3. Registrierung wie in Abb. 1. a) Bei ↑ I Injektion von 2,5 mg S i.v.; Bei ↑ II Injektion von 0,75 mg dTc i.v. — b) Bei ↑ I Injektion von 1,25 mg S i.v.; Bei ↑ II Injektion von 0,15 mg dTc i.v.

Die Umkehr der Injektionsreihenfolge — erst D oder S, dann dTc — bestätigte die vorbeschriebenen Ergebnisse hinsichtlich der antagonistischen Effekte besonders deutlich am Beispiel der Kontraktionshöhen. Wurde z. B. S vorinjiziert und unmittelbar darauf dTc verabfolgt, so konnte durch dTc der typische Abfall der Kontraktionshöhen entscheidend gemindert werden und betrug im Durchschnitt nicht mehr als 15% des Ausgangswertes gegenüber einer meist mehr als 50%igen Senkung bei alleiniger S-Anwendung, gleicher Zeit und Dosis. Je früher das dTc injiziert wurde, desto deutlicher war der antagonistische Effekt. Erfolgte die Zweitinjektion an einem Zeitpunkt, in dem eine direkte Erregbarkeit des Muskels noch vorhanden war, dann konnte ein antagonistischer Effekt in jedem Falle erzielt werden, die Kontraktionshöhen verblieben auf dem Niveau des letzten Wertes vor der dTc-Injektion (Abb. 3a). Wurde jedoch die dTc-Injektion erst nach Erlöschen der direkten Erregbarkeit des Muskels durch S oder D durchgeführt, so wurde bis zu 20 min nach der Zweitinjektion ein Effekt nicht gesehen (Abb. 3b).

3. Nach orientierenden Versuchen beträgt die Geschwindigkeit der Erregungsleitung am isolierten M. sartorius von Rana esc. etwa

6 m $\times$ sec^{-1}. Nach i.v.-Zufuhr von 0,2—0,4 mg D bzw. 1,25—2,5 mg S geht die Geschwindigkeit der Erregungsleitung auf etwa 50% des Ausgangswertes zurück, während nach gleicher Zufuhr von 0,15—0,45 mg dTc keine charakteristische Verminderung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit zu beobachten war.

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß den Verbindungen der Leptocuraregruppe außer den beschriebenen Angriffspunkten an der motorischen Nervenendplatte[2, 6, 11, 12, 13, 15, 30, 31] auch eine direkt — muskuläre Wirkung (Depolarisation der Muskelfasermembran) zu eigen ist[3, 4, 7, 8, 17, 18, 25]. Die in diesem Sinne sprechenden Befunde sind: Senkung der Kontraktionshöhen bei direkter maximaler Reizung, Verlangsamung der Geschwindigkeit der Erregungsleitung, Steigerung bzw. Verlängerung der Rheobase und Chronaxie bei direkter Reizung, Senkung des Verletzungspotentials[25]. Alle diese Meßgrößen werden durch dTc nicht sicher verändert.

Durch vorinjiziertes dTc konnten sowohl die Höhe, Anstiegszeit und Dauer der Leptocurarekontraktur als auch die muskuläre Erregbarkeitsherabsetzung (Kontraktionshöhenminderung) im Sinne einer Hemmung beeinflußt werden.

Bei Nachinjektion von dTc ist der Zeitpunkt der Nachinjektion entscheidend: War der Muskel nach D- und S-Applikation noch erregbar, dann wurde die Wirkung der Erstinjektion sicher gehemmt. Ein vollständiger Block bei aufgehobener direkter Erregbarkeit konnte nicht beeinflußt werden. Mithin kann man von einem echten Antagonismus nur dann sprechen, wenn dTc vor- und D oder S nachinjiziert werden. Allerdings sind hier Zeitbedingungen und die Relation der Dosen von entscheidender Bedeutung. Die Tatsache, daß sich Funktionsänderungen des quergestreiften Kaltblütermuskels nach D oder S durch nachinjiziertes dTc in ihrer weiteren Entwicklung hemmen lassen, kann kaum als Antagonismus im strengen Sinne interpretiert werden. Dabei spielt vor allem das zeitliche Intervall zwischen beiden Injektionen eine Rolle. Möglicherweise handelt es sich im ersten Falle darum, daß die Rezeptoren für D oder S durch vorhergegebenes dTc blockiert sind, während im zweiten Fall noch freie Rezeptoren durch dTc blockiert werden, so daß sich die vollständige Wirkung von D oder S nicht durchsetzen kann. Daneben muß in Erwägung gezogen werden, daß dTc die Membran nicht nur der Nervenendplatte, sondern auch der Muskelfaser selbst so „stabilisiert", daß eine Depolarisation (Senkung des Membranruhepotentials) durch D oder S nicht erfolgen kann, während umgekehrt dTc nicht in der Lage ist, ein durch D oder S gesenktes Membranruhepotential wieder zu heben, sondern höchstens eine durch D oder S eingeleitete Senkung

des Membranruhepotentials zu fixieren. Diese Deutung erscheint nach den Messungen Thesleffs[27] problematisch, da hier mit Innenelektroden am M. sartorius vom Frosch grundsätzliche Unterschiede des Wirkungsmechanismus z. B. von dTc, D und S nicht gefunden werden konnten. Infolge der großen Streuungsbreite der Empfindlichkeit verschiedener Tiere gegen die hier angewandten Substanzen, zu der noch eine verschiedene Empfindlichkeit der einzelnen Muskeln kommt, ist es schwierig, unsere Ergebnisse mit anderen zu vergleichen[24, 1, 16]. Die grundsätzlich gleichen Ergebnisse bezüglich eines möglichen Antagonismus zwischen dTc-D und S und umgekehrt lassen sich jedoch auch am spontan innervierten Zwerchfell der Katze beobachten[26] (unveröffentlicht).

Zusammenfassung

Am in situ befindlichen durchbluteten M. gastrocnemius von Rana esc. beeinflußt d/Tubocurarin (dTc) das Mechanogramm nur unwesentlich, vor allem im Sinne einer Verringerung des Ruhetonus; Dekamethonium (D) und Succinylcholin (S) bewirken dagegen in Abhängigkeit von der applizierten Dosis eine initiale Kontraktur und eine deutliche Verminderung der Kontraktionshöhe bis zum Fehlen jeglicher Reizbeantwortung des Muskels.

Durch vorherige Gabe von dTc ist es möglich, die nach D oder S auftretenden Funktionsänderungen in ihrem Ausmaße zu hemmen oder ganz zu verhindern. Wird dTc nach D oder S zugeführt, dann gelingt es, in Abhängigkeit vom zeitlichen Intervall zwischen beiden Applikationen die weitere Entwicklung der nach D oder S auftretenden Funktionsänderungen zu verhindern.

Während die Geschwindigkeit der Erregungsleitung am nervenfreien Ende des M. sartorius von Rana esc. durch dTc nicht verändert wird, reduziert D oder S die Geschwindigkeit der Erregungsleitung auf die Hälfte des Normalwertes.

Die Befunde sprechen dafür, daß auch am Kaltblütermuskel eine Wirkung von D oder S nicht nur auf die motorische Nervenendplatte beschränkt bleibt, sondern daß vermutlich die Membran der Muskelfaser selbst eine Alteration erfährt.

Literatur

[1] Barth, L.: Dtsch. Gesundheitswesen 8, 825 (1953). — [2] Bovet, D., F. Bovet-Nitti, S. Guarino, V. G. Longo et R. Fusco: Recherches sur les poissons curarisants de Synthése. III. Arch. internat. Pharmakodynamie 88, 1 (1951). — [3] Brown, G. L., W. D. N. Paton and V. M. Dias J. of Physiol. 108, 15 (1949). — [4] Burns, B.D. and W. D. M. Paton: J. of Physiol. 115, 41 (1951). — [5] Castillo, J. C., A. P. Phillips and E. J. de Beer: J. of Pharmacol. 97, 150 (1949). — [6] Castillo, J. C., and E. J. de Beer: J. of Pharmacol. 99, 458 (1950). — [7] Dallemagne, M. J., and E. Philippot: Brit. J. Pharmacol. 7, 601 (1952). — [8] Dallemagne, M. J., and E. Philippot: Experienta (Basel) 9, 427 (1953). — [9] Fleckenstein, A., H. Hille

u. W. E. Adam: Pflügers Arch. **253**, 264 (1950). — [10] Fleckenstein, A., u. W. Richter: Pflügers Arch. **257**, 1 (1953). — [11] Fleckenstein, A.: Anästhesist **3**, 15 (1954). — [12] Fleckenstein, A., J. Eigler u. H. Bruch: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 483 (1955). — [13] Fleckenstein, A.: Der Kalium-Natrium-Austausch. Springer 1955. — [14] Ginzel, K. H., H. Klupp u. G. Werner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **213**, 435 (1951). — [15] Ginzel, K. H., H. Klupp u. G. Werner: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **215**, 103 (1952). — [16] Hutter, O. F., and J. E. Pascoe: Brit. J. Pharmacol. **6**, 691 (1951). — [17] Jarcho, L. W., C. Eyzaguirre, S. A. Talbot and J. L. Lilienthal, Jr.: Amer. J. Physiol. **162**, 475 (1950). — [18] Jarcho, L. W., B. Berman, C. Eyzaguirre and J. L. Lilienthal Jr.: Ann. New York Acad. Sci. **54**, 3, 337 (1951). — [19] Katz, B.: J. of Physiol. **95**, 286 (1939). — [20] MacFarlane, D. W., K. R. Unna, E. W. Pelikan, K. J. Cazort, M. S. Sadove and J. T. Nelson: J. of Pharmacol. **99**, 226 (1950). — [21] Malorny, G., zit. bei V. Brücke, F.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 83 (1953) (Tagungsbericht). — [22] Nordqvist, P.: Acta pharmacol. ((Københ.) **8**, 207 (1952). — [23] Nordqvist, P.: Acta pharmacol. (Københ.) **8**, 226 (1952). — [24] Paton, W. D. M., and E. J. Zaimis: Brit. J. Pharmacol. **4**, 381 (1949). — [25] Steinke, H. J., u. G. Vogel: Pflügers Arch. **259**, 152 (1954). — [26] Steinke, H. J., u. G. Vogel: unveröffentlicht. — [27] Thesleff, S.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **34**, 218 (1955). — [28] Vogel, G., H. Krause u. E. Krämer: Pflügers Arch. **261**, 486 (1955). — [29] Winter, C. A., and J. T. Lehman: J. of Pharmacol. **100**, 489 (1950). — [30] Zaimis, E. J.: J. of Physiol. **112**, 176 (1951). — [31] Zaimis, E. J.: Nature (Lond.) **170**, 617 (1952).

Prof. Dr. G. Vogel, Institut f. Veterinär-Physiologie d. Humboldt-Universität, Berlin N 4, Max-Reinhardt-Str. 4

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 547—555 (1956)

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Leipzig
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c. Dr. h. c. M. Bürger)

Mechanische Systole und elektrische Erregungsdauer unter Amylnitrit

Von
D. Michel

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. Februar 1956)

Die elektrokardiographischen Veränderungen unter Amylnitritwirkung waren schon mehrfach Gegenstand eingehender Untersuchungen[1, 8, 9, 10, 11, 12, 23, 25, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 39]. Im Zusammenhang mit unserem Thema interessiert vor allem, daß von mehreren Autoren eine Verlängerung der frequenzbezogenen, also relativen QT-Zeit gefunden wurde. Nordenfelt bringt diese Verlängerung mit der trägen Anpassung der QT-Zeit an plötzliche Frequenzänderungen in Verbindung, und zwar, wie Lepeschkin[26] betont, mit Recht.

Bei elektrokardiographischen Untersuchungen nach Amylnitriteinwirkung, die aus einer bestimmten, hier nicht interessierenden Fragestellung von Scholz an unserer Klinik durchgeführt wurden, bemerkten wir eine auffallende Divergenz von mechanischer Systolen- und elektrischer Erregungsdauer. Im Hinblick auf die aktuelle Problematik der Hegglinschen energetisch-dynamischen Herzsuffizienz schien uns eine Überprüfung dieses Befundes an einem größeren Material lohnend.

Methodik

Zu den Untersuchungen wurden 75 klinisch herzgesunde Probanden beiderlei Geschlechts im Alter von 17—70 Jahren herangezogen. Zunächst fertigten wir bei völliger Ruhe das Extremitäten-Elektrokardiogramm und Phonokardiogramm an. Zur Verfügung stand hierfür ein Mehrfach-Schwarzer-Direktschreiber, der die simultane Aufnahme von drei Gliedmaßenableitungen und drei Tonkurven (Frequenzfilter 35 Hz, 70 Hz, 140 Hz) erlaubte. Zeitkonstante des Gerätes: 1,9 sec.

Anschließend ließen wir die Probanden 6 Tropfen Amylnitrit in zwei Atemzügen inhalieren und schrieben auf der Höhe der danach einsetzenden Tachykardie (im Durchschnitt 15—20 sec nach der Amylnitritverabreichung) ein weiteres Phonoelektrokardiogramm.

Die Dauer der mechanischen Systole ist in bekannter Weise durch das Intervall Q-II. Herzton gegeben. Die elektrische Erregungsdauer ist markiert durch den Anfang von Q und das Ende von T bzw. dem Moment, in dem die Stromkurve nach erfolgter Erregungsrückbildung endgültig die Null-Linie wieder erreicht. Bei den Amylnitritkurven ergaben sich hierbei zum Teil erhebliche Schwierigkeiten, auf die

noch näher einzugehen sein wird. War die QT-Zeit gut abgrenzbar, so wurde sie von der frühest einsetzenden Q-Zacke bis zum Ende der zuletzt zur Null-Linie zurückkehrenden T-Zacke gemessen, wobei es gleichgültig war, ob beide Punkte in der gleichen oder in verschiedenen Ableitungen lagen.

Sowohl die Werte für Q-II. Ton als auch für die Dauer der elektrischen Erregung sind Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen.

Untersuchungsergebnisse

1. Mechanische Systole. Nach Herkel u. Nürmberger läßt das Intervall Q-II. Herzton die gleiche Frequenzabhängigkeit erkennen wie die QT-Zeit. Die Dauer der mechanischen Systole fällt damit in den Streubereich der Hegglin-Holzmannschen Formel[17], was auch von Hegglin[14] betont wird. Freilich fehlt es auch

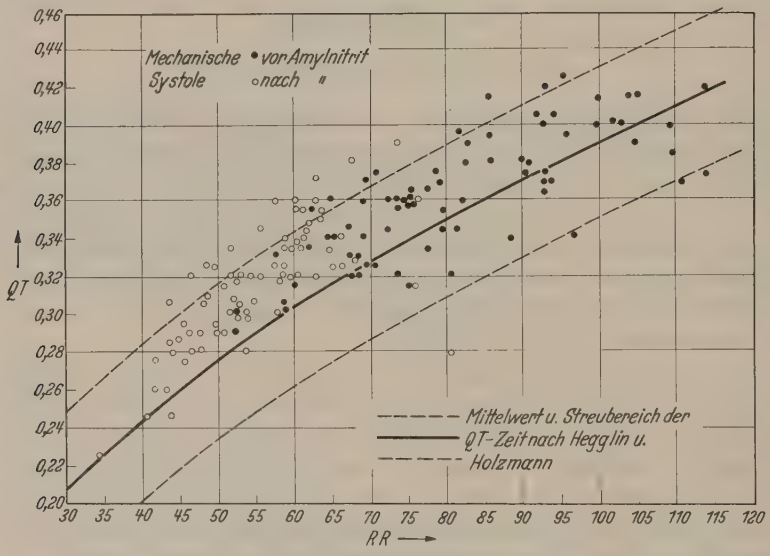


Abb. 1. Intervall Q-II. Herzton vor und nach Amylnitrit und seine Beziehungen zum frequenzabhängigen Normalwert

nicht an Stimmen, nach denen der Streubereich um einen weitgehend mit dem der QT-Zeit übereinstimmenden Mittelwert größer ist als $\pm 0{,}04$ sec[2, 3, 27].

Wenn ich im folgenden trotzdem als Maßstab die Formel von Hegglin u. Holzmann wählte, so hat das seinen Grund darin, daß es in der vorliegenden Arbeit nicht auf Absolutwerte ankam. Es interessierten allein die durch Amylnitrit ausgelösten relativen Veränderungen. Und hierbei gewährt die genannte Formel recht anschauliche Einblicke.

In Abb. 1 sind die Einzelwerte der 75 Probanden eingetragen. Es zeigt sich, daß tatsächlich vor Verabreichung von Amylnitrit, also unter Ruhebedingungen, die mechanische Systole den Streubereich der QT-Zeit kaum überschreitet, wobei sich die Einzelwerte annähernd gleichmäßig um den Mittelwert gruppieren. Lediglich in 11 Fällen lag der Wert etwas außerhalb der frequenzbezogenen Norm.

Unter Amylnitrit setzt eine deutliche Verschiebung der Ruheverhältnisse ein. Die übergroße Zahl der Einzelwerte findet sich jetzt im Plusbereich der normalen Streuung. Bei 14 Probanden liegen die Werte nach Amylnitritmedikation außerhalb der frequenzabhängigen Normgrenze. Die maximale Überschreitung dieses Grenzwertes beträgt 0,025 sec.

Nur in einem Fall wird eine relative Verkürzung der mechanischen Systole, und zwar um 0,03 sec, nachgewiesen.

Ohne Rücksicht auf absolute Werte kann also gesagt werden, daß unter Amylnitrit in der Regel eine mehr oder minder ausgeprägte Verlängerung der relativen mechanischen Systole resultiert.

2. *Elektrische Erregungsdauer.* Unter Ruhebedingungen entsprechen bei unseren 75 Probanden die *QT*-Zeiten mit vier Ausnahmen dem von

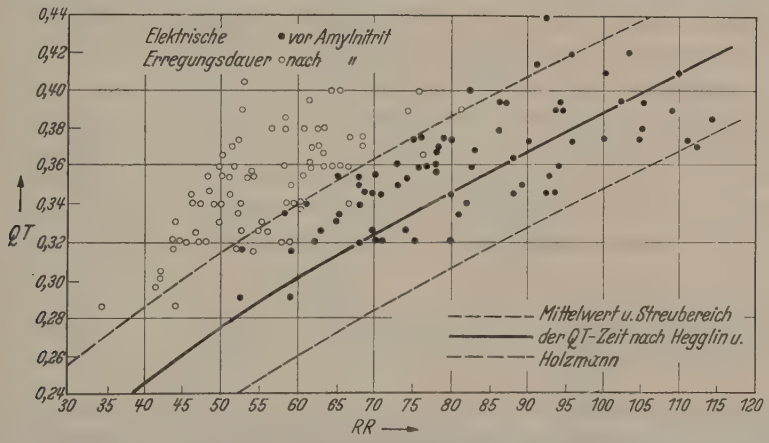


Abb. 2. Elektrische Erregungsdauer vor und nach Amylnitrit und ihre Beziehungen zu den normalen frequenzabhängigen *QT*-Zeiten

Hegglin u. Holzmann angegebenen frequenzabhängigen Streubereich (Abb. 2).

Nach Verabreichung von Amylnitrit ergibt sich aber ein Bild, das in viel stärkerem Maße als bei der mechanischen Systole von den Ruheverhältnissen abweicht. Mit Ausnahme von 10 Probanden finden sich die für die elektrische Erregungsdauer gemessenen Werte sämtlich außerhalb des normalen Streubereiches, wobei die größte Differenz zum Mittelwert 0,13 sec beträgt.

Ich habe im letzten Satz bewußt das Wort *QT*-Zeit vermieden. Der an sich unglückliche Begriff „elektrische Systole“ [21, 34] wäre hier sehr ungenau. Eine genaue Analyse der Kurven zeigt nämlich, daß bei einem Großteil der Kurven die gemessenen Werte nicht als *QT*-Zeit rubriziert werden können. Während in dem Ruhe-Elektrokardiogramm eine Abgrenzung der *T*-Zacke ohne Schwierigkeiten möglich ist, gelingt das nach

Amylnitrit nur bei einem Teil der Fälle. Meist ist in den Kurven das Ende der T-Zacke nicht sicher auszumachen. Das hat seine Ursache einmal in dem Befund, daß infolge der zum Teil beträchtlichen Frequenzzunahme eine mehr oder minder erhebliche Vorhofpfropfung und damit eine Überlagerung des Ventrikel- und Vorhofelektrokardiogramms eintritt, und zum anderen in der Tatsache, daß neben einer Verlagerung und

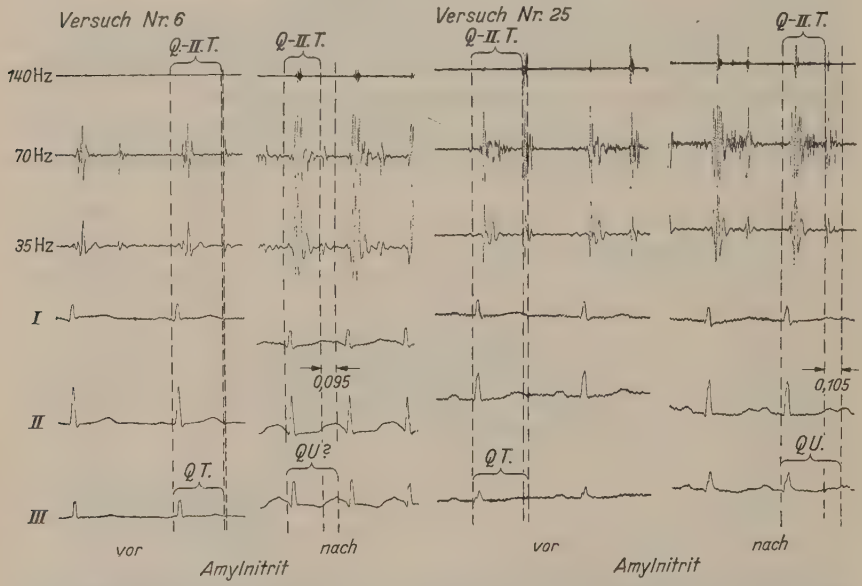


Abb. 3. Phonoelektrokardiogramm von zwei Versuchspersonen vor und nach Amylnitrit. Die Zunahme der Differenz zwischen II. Herzton und Ende der elektrischen Erregungsdauer kommt nach Amylnitrit deutlich zum Ausdruck. Gleichzeitig läßt die Abbildung die formalen Änderungen des Kurvenverlaufs erkennen

Verformung der ST-Strecke und der T-Zacke ein flüssiger Übergang aus einem sehr flachen oder gar negativen T-Anteil in eine terminale Positivität vorhanden ist (siehe Abb. 3, Vers.-Nr. 6 und 25).

Bis vor nicht allzu langer Zeit wurden derartige Befunde als QT-Verlängerung deklariert. Neuere Untersuchungen[20, 27] haben aber ergeben, daß es sich hierbei fast stets um TU-Verschmelzungswellen handelt. Die Entscheidung, ob es sich um eine TU- oder QT-Anomalie handelt, kann freilich im Einzelfall höchst schwierig, wenn nicht gar unmöglich sein. Eine Abgrenzung ist nach Holzmann[21] durch simultane Schreibung von Gliedmaßen- und Brustwandableitungen erreichbar, da sich häufig wenigstens in einer Ableitung eine Trennung von T und U vornehmen lasse. Lepeschkin u. Surawicz richten sich demgegenüber nach dem II. Herzton. Ist sein Intervall zur Q-Zacke unter Berücksichtigung der Frequenz normal, so handele es sich bei erheblichen Verlängerungen des Kammerelektrokardiogramms stets um TU-Verschmelzungswellen und nie um QT-Verlängerungen.

Die häufigste, übrigens auch noch jetzt nicht selten als QT-Verlängerung mißdeutete TU-Verschmelzung findet sich bei Hypokaliämie.

Die von uns unter Amylnitrit beobachteten Veränderungen von *ST*, *T* und *U* lassen sich formal zwanglos in die von Bellet u. Mitarb. aufgestellten verschiedenen EKG-Abweichungen bei Hypokaliämie einordnen. Die Mehrzahl unserer Fälle wäre nach der Holzmannschen Einteilung[21] zu den gegensinnigen *TU*-Verschmelzungswellen bzw. zu Verschmelzungswellen mit dominierender *U*-Komponente zu rechnen.

Daß es sich unter Amylnitrit effektiv um derartige *TU*-Anomalien und nicht um *QT*-Verlängerungen handelt, geht einmal aus dem recte oder trotz vergrößerter Differenz zum Ende des elektrischen Vorgangs verspätet einfallenden II. Herzton und zum anderen zumindest bei einem Teil der Elektrokardiogramme aus dem Kurvenbild hervor.

Ohne daß in der vorliegenden Untersuchungsreihe Brustwandelektrokardiogramme angefertigt wurden, ließ sich doch vielfach in einer der drei Extremitätenableitungen ein Knick oder eine Stufe zwischen *T* und *U* erkennen. Häufig ging allerdings die *U*-Zacke direkt in die *P*-Zacke über, so daß die in Abb. 2 eingezeichneten *QU*-Intervalle mangels genügender Abgrenzbarkeit des Endpunktes nicht selten zu kurz bemessen sein dürften. Immerhin kann gesagt werden, daß die von uns gemessenen *QU*-Zeiten mit den Angaben der Normwerte dieses Intervalls von Lepeschkin u. Surawicz[28] gut übereinstimmen.

So sieht man in Abb. 3, Versuchs-Nr. 6, besonders in Abl. III, wie die negative *T*-Zacke nach Erreichen der isoelektrischen Linie winklig in eine positive Welle abknickt, die ihrerseits mit der *P*-Zacke verschmilzt und von deren Gipfel überragt wird, ohne daß Sicheres über das Ende der *U*-Zacke ausgesagt werden könnte.

Die bisher im Schrifttum unter Amylnitrit beschriebenen und auf eine verlangsamte Anpassungsfähigkeit bezogene verlängerte *QT*-Zeit entspricht also in Wirklichkeit der *QU*-Zeit. Sie sagt damit nichts über die tatsächliche Dauer der Erregungsausbreituug und -rückbildung in den Kammern aus. Vielleicht ist der in dieser Arbeit gewählte Ausdruck „elektrische Erregungsdauer" unkorrekt, da die *U*-Welle wohl nicht mehr in die systolische Phase der Herzaktion gehört, sondern ein positives diastolisches Potential darstellt. Solange aber über die Genese der *U*-Welle (Nachpotential, diastolisches Potential) noch eine derartige Unklarheit herrscht wie gegenwärtig, mag dieser Begriff angängig sein, soweit man sich nur klar darüber ist, daß damit nichts über die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Herzphase ausgesagt wird.

In diesem Zusammenhang sei abschließend darauf verwiesen, daß im Amylnitrit eine Substanz zur Verfügung steht, die mit rund 45%iger Sicherheit (vgl. Tab. 1) *TU*-Anomalien hervorruft bzw. *U*-Zacken akzentuiert.

3. Differenz zwischen mechanischer Systole und elektrischer Erregungsdauer. Wie bereits erwähnt, geben Herkel u. Nürmberger die Differenz zwischen II. Herzton und Ende der *T*-Zacke mit 0,04 sec nach beiden Seiten an, Blumberger

u. Mitarb. mit 0,65 sec. Während Stoffel einen über 0,04 sec vor T-Ende einfallenden II. Herzton als nicht mehr physiologisch bezeichnet, führen Lepeschkin u. Surawicz aus, daß in allen bisher im Schrifttum abgebildeten Kurven, in denen der II. Herzton um 0,07 und mehr Sekunden dem Ende der T-Zacke vorausgeht, irrtümlicherweise die QU-Zeit infolge einer TU-Verschmelzung als QT-Zeit aufgefaßt wurde.

In unseren Fällen überdauert das Intervall Q-II. Herzton vor Amylnitrit die QT-Zeit im Mittel um 0,003 sec. Nach Amylnitritinhalation fällt der II. Herzton dagegen im Durchschnitt 0,035 sec vor dem abgrenzbaren oder vermeintlichen Ende der T- oder U-Zacke ein. Dieser Wert mag als nicht allzu bedeutend imponieren. Man muß sich aber vergegenwärtigen, daß nicht bei allen Probanden eine TU-Verschmelzungswelle auftritt. In den Wert 0,035 sec gehen also sowohl die Fälle mit auch nach Amylnitrit noch gut abgrenzbarer QT-Zeit als auch die Fälle mit TU-Verschmelzungswellen ein. Aufschlußreicher dürfte deshalb die Zusammenstellung der Tab. 1 sein. In ihr werden die Intervalle zwischen Ende der mechanischen Systole und Ende der elektrischen Erregungsdauer (T- *oder* U-Zacke) wiedergegeben, wobei zu sagen ist, daß dort, wo der II. Herzton dem Ende der elektrischen Erregungsdauer bis zu 0,04 sec vorangeht, in der Regel das QT-Intervall, in den Fällen dagegen, wo die Differenz größer ist, aus Gründen, die eben angegeben wurden, das QU-Intervall gemessen wurde.

Besprechung

Da über Ursachen und Entstehung der U-Zacke nur unbewiesene Vorstellungen existieren, kann nichts über die Bedeutung dieser Zacke unter Amylnitritwirkung ausgesagt werden. Trotzdem erscheint uns die Kenntnis des Auftretens von TU-Anomalien einschließlich der dabei zu beobachtenden ST-Veränderungen bei herzgesunden Probanden wichtig, insbesondere auch im Hinblick auf die wiederholt angestellten Versuche, mit Hilfe der Amylnitritreaktion zwischen funktioneller und organischer

Tabelle 1. *Zeitliches Intervall zwischen II. Herzton und Ende der elektrischen Erregungsdauer.* (Minuswerte besagen, daß der zweite Herzton vor dem Ende von T oder U liegt)

Intervall in sec	Vor Amylnitrit		Nach Amylnitrit	
	Fallzahl	in %	Fallzahl	in %
— 0,090 bis — 0,110 . .	—	—	3	4,0
— 0,065 bis — 0,085 . .	—	—	8	10,6
— 0,040 bis — 0,060 . .	—	—	23	30,7
— 0,015 bis — 0,035 . .	13	17,3	22	29,4
+ 0,010 bis — 0,010 . .	43	57,4	18	24,0
+ 0,015 bis + 0,035 . .	18	24,0	1	1,3
+ 0,040 bis + 0,060 . .	1	1,3	—	—

Genese mancher EKG-Veränderungen zu differenzieren, worauf aber hier nicht näher eingegangen werden soll.

Im vorstehenden wurde auf die Ähnlichkeit der Amylnitrit-Elektrokardiogramme und der Hypokaliämie-Elektrokardiogramme hingewiesen. Bereits die von Jung u. Jantz veröffentlichten Kurven bei paroxysmaler familiärer Lähmung lassen mit aller nur wünschenswerten Deutlichkeit erkennen, daß unter Absinken des Serumkaliums eine Verschmelzung der *T*-Welle mit einer betonten *U*-Welle zustande kommt. Wenn später dieser Befund als *QT*-Verlängerung und relativ charakteristisches Merkmal der Hypokaliämie[4, 5, 13, 14, 15, 16] bzw. einer Änderung des Konzentrationsgefälles zwischen intra- und extracellulärem Kalium[24] interpretiert wurde, so mag das seinen Grund darin haben, daß eben in der überwiegenden Zahl der Fälle eine sichere Trennung zwischen *T* und *U* nicht möglich ist, die wahren Zusammenhänge damit verkannt wurden.

Die Tatsache, daß bei Hypokaliämie recht auffallende Elektrokardiogrammveränderungen mit einer Vergrößerung des Intervalls zwischen II. Herzton und dem Ende der elektrischen Erregungsdauer auftreten können, bleibt bestehen. Die *TU*-Anomalien zeigen aber nicht ein Auseinanderweichen von elektrischem Geschehen und wirksamer mechanischer Systole an. Von einem vorzeitigen Abbruch der mechanischen Systole kann gar keine Rede sein. Die theoretische und klinische Wertigkeit der energetisch-dynamischen Herzinsuffizienz unterliegt damit zumindest im Zusammenhang mit hypokaliämischen und verwandten Zuständen erheblichen Zweifeln.

Trotzdem sind die *T*- und *TU*-Veränderungen bei Kaliummangel nicht spezifisch. Der gleiche Befund kann bei Sympathicotonie, nach sympathicomimetischen Substanzen, Insulin und Veratrin beobachtet werden[6]. Es erscheint aber bedeutsam, daß Carlsten die Wirkung der genannten Substanz auf das Elektrokardiogramm durch Zufuhr von Kalium aufheben bzw. hemmen konnte. Sjöstrand verleiht deshalb der Vermutung Ausdruck, daß durch die erwähnten Substanzen die Wiederherstellung des Elektrolytgleichgewichtes verzögert werde. Damit würden aber auch in diesen scheinbar unspezifischen, nämlich nicht mit Hypokaliämie einhergehenden Fällen Bedingungen vorliegen, durch die der Einfluß des Kaliums auf Stoffwechsel- und Erregungsvorgänge des Herzmuskels beeinträchtigt wird.

Das Amylnitrit ist nun aber auch eine Substanz mit sympathicomimetischer Wirkung. Heymans u. Bouckaert nehmen einen sympathischen Effekt über die Chemoreceptoren, Matthes eine reflektorische Tonussteigerung des sympathischen Systems bzw. eine Adrenalinausschüttung an. Jedenfalls kommt es im Verlauf der Amylnitritwirkung zu einer mitunter ganz beträchtlichen Tachykardie (maximal

bis 90 min Frequenzzunahme in unserer Versuchsreihe), die gewöhnlich dem durch die Droge ausgelösten Blutdruckabfall um 3—5 sec vorausgeht[29]. Charakteristischerweise fanden sich die stärksten Elektrokardiogrammveränderungen im Sinne des Hypokaliämie-Elektrokardiogramms bei erheblichen Frequenzzunahmen.

Damit erscheint der Gedanke nicht so abwegig, daß der Amylnitritwirkung auf das Elektrokardiogramm der gleiche Mechanismus wie bei den oben erwähnten Substanzen zuzuschreiben ist. Das würde aber bedeuten, daß auch beim Amylnitrit nicht nur das Elektrokardiogramm formal dem Hypokaliämie-Elektrokardiogramm ähnelt oder gleicht, sondern daß tatsächlich, etwa im Sjöstrandschen Sinne, eine das Kalium einbeziehende Änderung oder Beeinträchtigung des kardialen Zellstoffwechsel vorliegt.

Zusammenfassung

1. Unter Amylnitrit kommt es zu einer meist nur mäßigen relativen, also frequenzbezogenen Verlängerung der mechanisch wirksamen Systole.

2. Unter Amylnitrit kommt es im Elektrokardiogramm zu *TU*-Verschmelzungswellen, wodurch bisher irrtümlich eine *QT*-Verlängerung angenommen wurde. Der zweite Herzton geht in rund 50% der Fälle dem Ende der elektrischen Erregungsdauer (in diesen Fällen *U*-Zacke) um über 0,04 sec voraus, ohne daß es sich um das Bild der energetisch-dynamischen Herzinsuffizienz handelt.

3. Unter Amylnitrit ähnelt oder gleicht das Elektrokardiogramm dem Hypokaliämie-Elektrokardiogramm.

Literatur

[1] Bartsch, H., u. F. Nagl: Wien. Arch. inn. Med. **30**, 147 (1937). — [2] Blumberger, Kj.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **12**, 149 (1939). — [3] Blumberger, Kj. Hütten, H., K. Klein u. A. Graf: Dtsch. Arch. klin. Med. **187**, 1 (1940). — [4] Bellet, S., and W. W. Dyer: Amer. Heart J. **13**, 72 (1937). — [5] Bellet, S., C. S. Nadler and M. Lanning: Amer. J. Med. Sci. **219**, 542 (1950). — [6] Cannon, P. u. T. Sjöstrand: Acta med. scand. (Stockh.) **146**, 191 (1953). — [7] Carlsten, A.: Acta med. scand. (Stockh.) **146**, 424 (1953). — [8] Cataldi, L.: Cuore **19**, 87 (1934). — [9] Dunis, E., u. C. Korth: Dtsch. Arch. klin. Med. **183**, 230 (1938). — [10] Evans, C., and H. Hoyle: Lancet **1933**, 1109. — [11] Gelman, J., u. S. Brown: Acta med. scand. (Stockh.) **92**, 429 (1937). — [12] Griffith, G. C., and J. Cohn: Quart. J. Med. **1910**, 3142. — [13] Hegglin, R.: Schweiz. med. Wschr. **1941**, 268. — [14] Hegglin, R.: Arch. Kreislaufforsch. **13**, 173 (1944). — [15] Hegglin, R.: Die Klinik der energetisch-dynamischen Herzinsuffizienz. Basel 1947. — [16] Hegglin, R.: Klin. Wschr. **1949**, 330. — [17] Hegglin, R., u. M. Holzmann: Z. klin. Med. **132**, 1 (1937). — [18] Herkel, W., u. W. Nürmberger: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **12**, 143 (1939). — [19] Heymans, C., u. J. J. Bouckaert: Erg. Physiol. **41**, 28 (1939). — [20] Holzmann, M.: Verh. dtsch. Ges. Kreislaufforsch. **20**, 256 (1954). — [21] Holzmann, M.: Klinische Elektrokardiographie. Stuttgart 1955. — [22] Jung, R., u. H. Jantz: Verh. dtsch.

Ges. Kreislaufforsch. **12**, 217 (1939). — [23] Kobayashi, T.: Acta Scholae med. Kyoto **34**, 365 (1932). — [24] Kühns, K.: Z. Kreislaufforsch. **44**, 4 (1955). — [25] Landau, N.: Klin. Wschr. **1938**, 93. — [26] Lepeschkin, E.: Das Elektrokardiogramm. Dresden u. Leipzig 1947. — [27] Lepeschkin, E., and B. Surawicz: Circulation (New York) **6**, 378 (1952). — [28] Lepeschkin, E., and B. Surawicz: Amer. Heart J. **46**, 9 (1953). — [29] Matthes, K.: Kreislaufuntersuchungen am Menschen mit fortlaufend registrierenden Methoden. Stuttgart 1951. — [30] Nagl, F.: Klin. Wschr. **1935**, 1461; Wien. klin. Wschr. **1935**, 1543. — [31] Nordenfelt, O.: Acta med. scand. (Stockh.), Suppl. **119** (1941). — [32] Scherf, D.: Wien. klin. Wschr. **1927**, 113. — [33] Scholz, A.: Inaug-Diss., Leipzig 1955. — [34] Schütz, E.: Erg. Physiol. **38**, 491 (1936). — [35] Sebastiani, C.: Arch. Mal. Coeur **31**, 73 (1938). — [36] Siegel, A., and V. Feil: J. Clin. Invest. **10**, 795 (1931). — [37] Sjöstrand, T.: Acta med. scand. (Stockh.) **151**, 73 (1955). — [38] Stoffel, H.: Inaug.-Diss. Zürich 1942. — [39] Turner, W.: J. Amer. Med. Assoc. **100**, 38 (1933).

Dr. D. Michel, Leipzig C 1, Med. Klinik d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 556—565 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Göttingen
(Direktor: Prof. Dr. L. Lendle)

Die corticalen Hüpf- und Aufsetzreflexe nach Rademaker als Test für pharmakologische Großhirnwirkungen

Von
K.-P. Schaefer

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 22. Februar 1956)

In der neurophysiologischen Literatur (Dusser de Barenne, Fulton u. a.) werden die Hüpf- und Aufsetzreaktionen heute allgemein als „Rindenreflexe" beschrieben. Bei verschiedenen Tierarten wie Katzen, Hunden und Affen sind sie besonders ausgeprägt vorhanden, solange die sensomotorische Großhirnrinde funktionell nicht beeinträchtigt ist. Es liegt nahe, diese „Rindenreflexe" auch in pharmakologischen Untersuchungen zu verwenden, da die Prüfung cortical wirksamer Pharmaka sonst mit größerem operativen und technischen Aufwand verbunden ist (Dekortizierung, optischer Fallumdrehreflex, Elektrencephalogramm).

Die Hüpf- und Aufsetzreaktionen wurden bereits von Rademaker beschrieben und als bedingte, von der Großhirnrinde abhängige Reflexe gedeutet. Rademaker beschrieb proprioceptive, von der Muskelstellung abhängige Reflexe (vorwiegend die Hüpfreaktionen) und taktile, deren Auslösung durch den Tastsinn erfolgt (in erster Linie die Aufsetzbewegungen). In chronischen Versuchen an Katzen konnte Bard zeigen, daß eine engumgrenzte Exstirpation sensibler und motorischer Rindenteile die Hüpfreaktionen stark einschränkt und die Aufsetzreflexe für immer auslöscht. Bard erbrachte ferner den neurophysiologisch besonders wertvollen positiven Beweis (Dusser de Barenne), indem er den Cortex abtrug und lediglich die motorischen und sensiblen Areale um den G. sigmoides einer Seite stehen ließ. Die „Rindenreflexe" der entsprechenden kontralateralen Gliedmaßen blieben hierbei erhalten. In nachfolgenden Untersuchungen konnten von Bard u. Mitarb. (Bard u. Brooks, Woolsey u. Bard u. a.) weitere Einzelheiten geklärt werden.

Als Nachweismethode für pharmakologische Großhirnwirkungen kommen die Hüpf- und Aufsetzreflexe jedoch nur in Betracht, wenn mit Sicherheit erwiesen ist, daß sich die Zentren dieser Reflexe in der Großhirnrinde befinden. Mit der Exstirpation der sensomotorischen Rinde müßten auch die wirklichen Zentren der „Rindenreflexe" beseitigt sein. Es besteht aber noch die Möglichkeit, daß die in Frage kommenden Zentren in operativ nicht ausgeschalteten Gebieten des Stammhirnes liegen und durch die Dekortizierung lediglich funktionell beeinträchtigt

sind. Kritische Einwände von Rademaker und Bard selbst, die ebenfalls auf solche Möglichkeiten hinweisen, dürfen daher nicht unberücksichtigt bleiben.

In der vorliegenden Untersuchung sollte die Frage nach der Lokalisation der Hüpf- und Aufsetzreflexe erneut aufgegriffen und der corticale Charakter dieser Reflexe auf pharmakologischem Wege gesichert werden. Die gleichzeitige Prüfung der im Mittelhirn lokalisierten Stellreflexe nach Magnus gestattete eine vollständigere Charakterisierung einer zentralnervösen Wirkung.

Methodik und Ergebnisse

I. Versuche an Katzen nach einseitiger Ausschaltung der sensomotorischen Rinde

a) Zuerst wurde das Verhalten der Tiere nach einseitiger *operativer Abtragung* der sensomotorischen Rinde geprüft. Als Versuchstiere dienten 9 mittelgroße Katzen. In tiefer Pentobarbital-Narkose[1] wurde das Schädeldach seitlich der Mittellinie in Höhe der Sutura coronalis eröffnet. Die Abtragung der Rindengebiete im Bereich des G. sigmoides erfolgte unter möglichst sterilen Bedingungen. Die Hautwunde wurde anschließend durch Knopfnähte verschlossen. Die Tiere erhielten dann Penicillin und Traubenzucker. Nach 2—3 Tagen begannen sie spontan zu fressen und zeigten wieder positive Stellreflexe.

An allen Katzen führte die Abtragung der sensiblen und motorischen Rindenareale im Bereich des G. sigmoides zum Ausfall der Aufsetzreflexe der kontralateralen Seite. In einigen Fällen blieben — wohl in Abhängigkeit von der Ausdehnung der Rindenschädigung — der Tischrandreflex der Hinterpfote oder das Aufsetzen der Pfoten bei herabhängendem Vorder- oder Hinterkörper erhalten. Aufsetzen einer Kopfkappe — um den optischen Aufsetzreflex auszuschalten! — änderte dann nichts an der Ausführung dieser Reflexe. Auffällig war die oft mangelhafte Korrektur der betroffenen Extremitäten aus abnormen Stellungen, insbesondere Abduktionsstellung der Vorderpfoten und Vorwärtsstellung der Hinterpfoten. Abgeschwächter Stütztonus der entsprechenden Hinterextremität konnte ebenfalls beobachtet werden. Charakteristisch für den Ausfall der genannten corticalen Gebiete war auch die Unsicherheit in den kleinen Gelenken der kontralateralen Extremitäten. Die Tiere knickten mit den Pfoten um und ließen den sonst so geschmeidigen Gang vermissen. Die Hüpfreaktionen blieben dagegen konstant erhalten. Sie zeigten meist eine geringe Verspätung und nur in wenigen Versuchen eine stärkere Abschwächung.

Einige Katzen wurden bis zu 16 Wochen beobachtet. Die beschriebenen Reflexausfälle blieben während dieser Zeit konstant erhalten.

---

[1] Nach Luco u. Marconi: 1—1,5 cm³/kg i.p. der Lösung 0,03 g auf 1 cm³ einer 25%igen Urethanlösung.

b) Um den chirurgischen Eingriff am Zentralnervensystem, der allein schon als Ursache einer Reflexlähmung angesehen werden könnte, zu vermeiden, wurde in den folgenden Versuchen die Funktion der Großhirnrinde durch *Lokalanaesthesie* ausgeschaltet.

Die Versuche wurden an 4 Katzen durchgeführt. Das Schädeldach wurde in Höhe der Sutura coronalis eröffnet und die Kopfhaut anschließend wieder vernäht. Sobald die Tiere normales Reflexverhalten zeigten, wurde die Hautwunde unter Pantocain[1] (2%ig) erneut eröffnet. Die Ausschaltung der entsprechenden Rindenareale erfolgte sodann ebenfalls mit Pantocain.

Auch unter Pantocain zeigten sich nach wenigen Minuten die gleichen Symptome wie nach einer Exstirpation der sensomotorischen Rinde. Die Aufsetzreflexe waren vollkommen gelähmt, während die Hüpfreaktionen, wenn auch eingeschränkt, erhalten blieben.

c) Die Ausschaltung corticaler Impulse könnte auch eine Funktionsänderung (Entzügelung?) der im Stammhirn befindlichen Zentren hervorrufen. Die nach Dekortizierung auftretenden Wutreaktionen (shame rage), die Erhöhung des Adrenalin- und Zuckerspiegels sowie die oft beobachteten Empfindlichkeitssteigerungen auf zentral wirksame Pharmaka sprechen durchaus für eine veränderte Reaktionsweise. Schließlich muß daran gedacht werden, daß mit dem Ausfall der genannten Großhirnareale auch extrapyramidale Projektionen betroffen sind. Befänden sich die Zentren der Hüpf- und Aufsetzreflexe tatsächlich in den erhaltenen Teilen des Stammhirnes, so wäre es eine Täuschung, wollte man den Ausfall dieser Reflexe nach einer Dekortizierung als Beweis einer Rindenlokalisation hinnehmen. Soweit hier überhaupt eine Klärung möglich ist, bot die Pharmakologie in der Anwendung vor allem zentralnervös dämpfender Mittel einen Weg.

Für einige Stoffe, wie Narkotica (siehe Magnus, Schoen, Girndt u. a.), Megaphen (siehe Dasgupta u. Werner), Myanesin (Hennemann u. Scherrer) und auch Atropin (Dasgupta u. Werner), wurden zentralnervös dämpfende Wirkungen beschrieben. Wir verwendeten die genannten Pharmaka in Dosen, welche eine leichte Dämpfung entfalten mußten, die Aufsetzreflexe der gesunden Seite aber nicht lähmten. Die Reflexe der intakten Seite dienten hierbei als Test gegen eine unerwünschte totale Lähmung entsprechender Zentren. Die einseitige Ausschaltung der sensomotorischen Rinde erfolgte durch Pantocain oder Exstirpation. Alle Injektionen erfolgten i.p. oder i.m.

Unter Luminal[2] (5—10 mg/kg), Megaphen[3] (0,25—5 mg/kg), Myanesin[4] (10—30 mg/kg) und Atropin (0,1—5 mg/kg) konnte keine Wiederherstellung der „Rindenreflexe" beobachtet werden (siehe Abb. 1). Nach großen Dosen trat eher eine verstärkte Unsicherheit der bereits ihrer corticalen Steuerung beraubten Extremitäten auf. Um ein breites

[1] Salzsaures 4-Butylaminobenzoyl-dimethylaminoäthanol.
[2] Phenyläthylbarbitursäure.
[3] N-(3'-Dimethylamino-)propyl-3-chlor-phenothiazin.
[4] 3-o-Toloxy-1,2-propandiol.

Wirkungsspektrum zu erzielen, wurden die genannten Pharmaka auch untereinander kombiniert. Auch hierbei konnte nur eine Verschlechterung des Bewegungsablaufs festgestellt werden. Besonders die Kombination Megaphen (0,5—1 mg/kg) und Atropin (0,5—1 mg/kg) führte zu einem Verlust des Stellungssinnes der großen Gelenke. Dies zeigte sich darin, daß die gestreckten Pfoten auf glattem Boden, auf dem die Tiere vorher gut laufen konnten, nach vorne, seitwärts oder hinten wegrutschten. Die Bewegungen waren dann meist unkoordiniert, während die Funktion der

Abb. 1. Katze, 5 Tage nach Exstirpation der sensomotorischen Großhirnrinde links. Obwohl das Tier 1 mg/kg Megaphen i.m. bekam, blieb der Aufsetzreflex der rechten Vorderpfote negativ

nach einseitiger Rindenschädigung nicht betroffenen homolateralen Extremitäten voll erhalten blieb.

d) In weiteren Versuchen wurden Stoffe geprüft, die auf das Zentralnervensystem erregend wirken. Hier kam vor allem das Morphin in Frage, dessen erregende Wirkungskomponente an Katzen besonders deutlich hervortritt und selbst an Thalamuskatzen beobachtet werden kann (Girndt). Es zeigte sich, daß die Aufsetzreflexe an intakten Tieren auch bei hohen Morphindosen (5—10 mg/kg subcutan) erhalten blieben. Sie waren lediglich hypermetrisch und etwas ungenauer in der Durchführung. Die Hüpf- und Aufsetzreflexe können also bei einer Enthemmung im Bereich des Stammhirnes — wenn diese Enthemmung auch nicht ganz derjenigen nach Dekortizierung entspricht — vorhanden sein (siehe auch Schaefer).

Morphin wurde (1—5 mg/kg subcutan) auch an einseitig dekortizierten Katzen mit kontralateral gelähmten Aufsetzreflexen geprüft. Es bestand die Möglichkeit, daß die Aktivität der in Frage kommenden

Stammhirnzentren durch die Exstirpation der sensomotorischen Rinde herabgesetzt sei. Aber auch unter diesen Bedingungen gelang es nicht, die Rindenreflexe wieder zu erwecken. Entsprechende Untersuchungen mit Eserin (0,1—1,0 mg/kg i.p.), als einem Cholinesteraseblocker mit zentralnervös erregenden Wirkungen, hatten ebenfalls keinen Erfolg.

Interessant sind die Ergebnisse an 2 Katzen, bei denen bereits die alleinige Eröffnung des Schädeldaches zu einer Lähmung einiger Aufsetzreflexe geführt hatte. Geringfügige Läsionen der sensomotorischen Rinde oder ein lokales Ödem könnten hierfür als Ursache in Betracht kommen, da die Tiere sonst normales Verhalten zeigten und das Futter spontan zu sich nahmen. Im Gegensatz zu den Versuchen nach Exstirpation der sensomotorischen Großhirnrinde gelang es hier, die gelähmten Aufsetzreflexe durch Morphin (2 mg/kg subcutan) zu normalisieren. In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß Morphin in der verwendeten Dosierung bereits zur Erregung führt, die auch im Elektrencephalogramm bei corticaler Ableitung erkennbar ist (Leimdorfer).

II. Versuche an intakten, nicht voroperierten Katzen

Eine vergleichende Prüfung verschiedener Pharmaka auf die vorausgehend beschriebenen corticalen Reflexe sollte zeigen, ob Stoffe, die vorwiegend Großhirnfunktionen zum Erlöschen bringen, diese Reflexe spezifisch stören bzw. ob lähmende Pharmaka, die vorwiegend das Stammhirn ausschalten, die genannten Reflexe im Rahmen der Lähmungen weniger treffen. Durch diese Prüfung kann auch gezeigt werden, daß die corticalen Reflexe eine wichtige Ergänzung der Untersuchung von Körperstell- und Labyrinthreflexen nach Magnus bei der Analyse lähmender Stoffe darstellen.

a) Narkotica. Die Wirkung der Narkotica auf die Stellreflexe nach Magnus konnte in zahlreichen Arbeiten (siehe Magnus, Schoen u. Girndt) gesichert werden. Die vorliegenden Untersuchungen sollten klarstellen, in welchem Stadium der Narkose die „Rindenreflexe" gelähmt werden.

Die oft diskutierte Einteilung der Narkotica in Hirnrinden- und Hirnstammmittel (Pick) konnte nicht unberücksichtigt bleiben, da Stoffe mit bevorzugter Rinden- oder Stammhirnwirkung bei einer Prüfung der corticalen Reflexe verschiedene Ergebnisse liefern müßten. Interessant waren in diesem Zusammenhang Untersuchungen von Scheler, in denen die Pick'sche Theorie mit Hilfe des optischen Fallumdrehreflexes an Katzen, als einer corticalen Reaktion, überprüft wurde. Danach besteht kein Unterschied zwischen der Wirkung typischer Vertreter beider Stoffgruppen. Rinden- und Stammhirnmittel lähmten den optischen Fallumdrehreflex bei äquieffektiver Dosierung im Narkosestadium I—II (nach Girndt).

An Katzen wurden nun das „Rindenmittel" Chloralhydrat (30 bis 90 mg/kg) und das Stammhirnnarkoticum Luminal (10—30 mg/kg)

geprüft. Auch in diesen Untersuchungen zeigte sich, daß beide Stoffe ohne Unterschied die Aufsetzreflexe bereits im Stadium I—II (nach Girndt) beeinträchtigen. In diesem Narkosestadium waren die Tiere unsicher beim Laufen und korrigierten eine passiv erteilte Seitenlage verzögert. Progressivreaktionen und die Körperstellreflexe vom Kopf auf den Körper und vom Körper auf den Körper waren ebenfalls stark eingeschränkt.

Als besonders empfindlich erwies sich, wie in den vorangehenden Untersuchungen, der Tischrandreflex der Pfoten: Bei Berühren der Pfotenrücken mit dem Rand eines Tisches wurden die Pfoten nicht mehr auf die Tischplatte aufgesetzt. Die übrigen Aufsetzreflexe kamen etwas später zum Erliegen. Am widerstandsfähigsten blieben die proprioceptiv bedingten Hüpfreaktionen, die erst im Stadium II—III gelähmt wurden.

b) Blausäurevergiftung. Die große Empfindlichkeit corticaler Funktionen gegenüber Sauerstoffmangel ließ daran denken, die Hüpf- und Aufsetzreflexe auch unter derartigen Bedingungen zu überprüfen. Im Verlauf einer experimentellen Hypoxie müßten diese Reflexe, wenn sie auf eine intakte Rindenfunktion angewiesen sind, zeitlich vor den Stellreflexen nach Magnus ausfallen. Die Blausäurevergiftung, die zu einer experimentell leicht dosierbaren Hemmung der Gewebsatmung führt, erschien methodisch besonders geeignet, zumal sie unter ähnlichen Gesichtspunkten in der Physiologie bereits Verwendung fand (Ward). Ein narkoseähnlicher Zustand nach Blausäureinhalation wurde schon von Flury u. Heubner beschrieben. Das Auftreten von Krämpfen konnte in unseren Versuchen durch kleine wiederholte Einzelinjektionen meist hinausgeschoben werden.

Die Blausäurewirkung zeigte große Ähnlichkeit mit dem Ablauf einer Barbituratnarkose. An Meerschweinchen (jeweils 2 mg/kg KCN — in einigen Versuchen auch NaCN — im Abstand von wenigen Minuten) wurden zunächst die Körperstellreflexe gelähmt. Lediglich der Körperstellreflex auf den Kopf blieb länger erhalten. Dann versagten die Progressivreaktionen (Zehenspreizreflex) und anschließend die Labyrinthreflexe auf den Kopf. Als sehr resistent erwiesen sich die horizontalen Drehreaktionen. Während der Vergiftung traten tonisch-klonische Krämpfe in den Extremitäten auf, die in Rückenlage besonders deutlich hervortraten[1]. Am folgenden Tage war das Verhalten der Tiere unauffällig. Die Stellreflexe waren wieder positiv.

An Katzen (0,5—1 mg/kg KCN oder NaCN) konnte die gleiche Reihenfolge der Stellreflexlähmung beobachtet werden. Sehr empfindlich waren auch hier wieder die Aufsetzreflexe. Bevor die Magnusschen Reflexe beeinflußt wurden, versagte in einigen Versuchen deutlich der Tischrandreflex der Pfoten. Die Katzen konnten in diesem Stadium noch aufrecht stehen und laufen. Die Hüpfreaktionen blieben noch längere Zeit nachweisbar.

[1] Bei diesen Krämpfen handelt es sich nicht um Erstickungskrämpfe mit Lokalisation im Rückenmark, sondern sie können im Sinne Wards als Folgezustände nach pharmakologischer Ausschaltung des Cerebrums aufgefaßt werden (Decerebrierungsstarre).

c) Ferner wurde versucht, die Durchblutung des Gehirns durch *Ganglienblocker* herabzusetzen. Wenn die Gehirndurchblutung durch Ganglienblocker auch nur wenig beeinflußt werden kann (Bernsmeier u. Siemon), so gelang es doch in einigen Versuchen mit Pendiomid[1] in massiven Dosen (10—100 mg/kg i.p.), eine Wirkung auf die geprüften Reflexe zu erzielen. An Meerschweinchen zeigte sich zuerst der bei allgemeinem O_2-Mangel oft beobachtete frühe Ausfall der Körperstellreflexe. Dann kamen Progressivreaktionen, Labyrinthstellreflexe auf den Kopf und die horizontalen Drehreaktionen zum Erliegen. Gelang es an Katzen, die Körperstellreflexe zu beeinflussen, so wurden auch die Aufsetzreflexe der Pfoten beeinträchtigt.

d) Myanesin. Das „Interneuronengift" Myanesin wurde in die Untersuchungen einbezogen, da es ausgeprägte Stammhirnwirkungen besitzen soll (Hennemann u. Scherrer; Hennemann, Kaplan u. Unna). Wirkungen auf mono- und polysynaptische Reflexe wurden ebenfalls beschrieben (Taverner). Bei einer vergleichenden Prüfung mit den Stellreflexen nach Magnus war zu erwarten, daß die „Rindenreflexe" in einem späten Vergiftungsstadium gelähmt werden.

An Meerschweinchen wurden zuerst die Labyrinthstellreflexe auf den Kopf gelähmt (deutliches Kopfpendeln!). Bei der Prüfung des Fallumdrehreflexes fielen die Meerschweinchen in diesem Stadium bereits auf den Rücken. Es war überraschend zu beobachten, wie die Tiere sich aber anschließend aufrichteten und davonliefen. Die beschriebenen Wirkungen wurden mit 40—50 mg/kg i.p. erreicht. Bei 60 mg/kg wurden die horizontalen Drehreaktionen eingeschränkt und bei noch höheren Dosen (über 80 mg/kg) auch die Körperstellreflexe. 20 min nach Injektion zeigten die Tiere wieder annähernd normale Reflexe.

Bei Katzen waren etwa gleiche Dosen erforderlich. Nach Ausfall der Labyrinthstellreflexe auf den Kopf machte sich schon eine Unsicherheit beim Springen und Laufen bemerkbar, obwohl die Körperstellreflexe nach Magnus, die bei dieser Tierart bereits eine geringere Bedeutung besitzen als bei Meerschweinchen, erst später beeinflußt wurden. Interessant war, daß die Hüpf- und Aufsetzreaktionen lange erhalten blieben und erst mit den Körperstellreflexen ausfielen.

Myanesin vermag die narkotische Wirkung der Barbiturate zu verstärken und deren Exzitationserscheinungen zu verhüten (Berger u. Lynes). In eigenen Versuchen wurde Katzen, die sich in leichter Luminalnarkose befanden, zusätzlich Myanesin gegeben. Progressivreaktionen und Labyrinthreflexe auf den Kopf kamen ebenfalls zum Erliegen, ohne daß hierbei der Aufsetzreflex der Pfoten gelähmt wurde. Die Vertiefung der Narkose betraf also vorwiegend die im Stammhirn lokalisierten Stellreflexe. Bei alleiniger Luminalnarkose wären die Aufsetzreflexe zeitlich vor den Labyrinthreflexen ausgefallen.

[1] Dibromid des N, N, N′, N′-3-Pentamethyl-N, N′-diäthyl-3-aza-pentylen-1,5-diammoniums.

Diskussion

Die Entfernung der sensomotorischen Rinde führte zu einer Lähmung der Aufsetzreflexe, während die proprioceptiv bedingten Hüpfreaktionen mehr oder weniger eingeschränkt erhalten blieben. Die Ergebnisse von Rademaker und Bard konnten hiermit bestätigt werden. Auf pharmakologischem Wege gelang es dann, weitere Anhaltspunkte für die corticale Natur der Aufsetzreflexe zu gewinnen.

Zunächst war es wichtig, daß die lokale Applikation von Pantocain auf die sensomotorische Rinde das gleiche Reflexverhalten hervorrief wie die chirurgische Entfernung dieser Gebiete. Es gelang auch nicht, die nach einseitiger Rindenläsion beeinträchtigten Aufsetzreflexe durch zentralnervös dämpfende Mittel zu normalisieren. Selbst Megaphen, das die typischen Reaktionen dekortizierter Tiere wie z. B. die Wutreaktionen (shame rage) in geringsten Dosen auszulöschen vermag (Dasgupta u. Werner), hatte keinen Einfluß. Eine Enthemmung bestimmter Stammhirnzentren dürfte als Ursache der Lähmungen daher kaum in Betracht kommen. Die Versuche mit zentralnervös erregenden Giften, wie Morphin und Eserin, können ebenfalls in diesem Sinne gedeutet werden. Obwohl die zuletzt genannten Pharmaka ausgeprägte Stammhirnwirkungen besitzen, blieben die Aufsetzreflexe auch bei hohen Dosen erhalten. Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse an den voroperierten Katzen. Während die Aufsetzreflexe nach Exstirpation der sensomotorischen Rinde irreversibel gelähmt waren, konnten sie, sofern sie nach alleiniger Eröffnung des Schädeldachs nicht mehr vorhanden waren, durch Morphin wieder hergestellt werden. Auch die Versuche mit Luminal, Cyankali und Myanesin ließen erkennen, daß die Großhirnrinde weitgehend als „Zentrum" der Aufsetzreflexe angesehen werden muß.

Das Verhalten der proprioceptiv bedingten Hüpfreaktionen sprach in den pharmakologischen Versuchen dagegen nicht eindeutig für eine Abhängigkeit von der Rindenfunktion. Diese Reflexe blieben ja auch an dekortizierten Tieren, zumindest an Katzen, deutlich nachweisbar.

Wie aus den Versuchen an intakten Tieren hervorgeht, sind die Aufsetzreflexe bei einer vergleichenden Prüfung mit den Stellreflexen nach Magnus, deren Zentren sich bekanntlich im Mittelhirn und in der Medulla oblongata befinden, sehr wertvoll. Eine Gegenüberstellung von Rinden- und Stammhirnwirkungen ist hiermit an nichtnarkotisierten und nichtvoroperierten Tieren möglich. Andererseits können spinale oder weiter peripher gelegene Lähmungen bei Erhaltensein des einen oder anderen Reflexes mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden. In pharmakologischer Hinsicht erwies sich der „Tischrandreflex" als besonders empfindlich und zuverlässig.

Es bleibt noch ungeklärt, ob eine Lähmung der Aufsetzreflexe auch wirklich über eine direkte pharmakologische Wirkung auf die Großhirnrinde zustande kommt. Eine primäre Beeinflussung bestimmter Stammhirngebiete, die z. B. für den Schlaf- und Wachzustand der Rinde verantwortlich sind und das Großhirn für aufsteigende Impulse aktivieren sollen, wäre auf Grund neuerer Untersuchungen (Magoun, Fulton) durchaus denkbar. Das Verhalten der Aufsetzreflexe — und aller übrigen

corticalen Nachweisreaktionen — würde unter diesen Umständen nur den funktionellen Zustand der Großhirnrinde wiederspiegeln, aber noch keine Aussage über den wahren Angriffspunkt des untersuchten Pharmakons erlauben. Die enge funktionelle Verkettung zwischen Großhirnrinde und Hirnstamm kommt in den vorliegenden Untersuchungen vielleicht auch darin zum Ausdruck, daß zwischen dem Ausfall der Aufsetzreflexe und der Lähmung der Körperstellreflexe bei vielen Stoffen eine auffällige zeitliche Parallelität besteht (Narkotica, Cyankali, Myanesin, Cholinesterasehemmer und anderes).

Es muß auch berücksichtigt werden, daß der funktionelle Zustand der sensomotorischen Rinde an einem peripher gelegenen Erfolgsorgan geprüft wird. Das injizierte Pharmakon kann selbstverständlich auch den extracorticalen Anteil des jeweiligen Reflexbogens beeinflussen und damit die eigentliche Rindenwirkung verschleiern. Bleiben die Aufsatzreflexe im Verlauf einer Vergiftung erhalten, so bestehen in dieser Hinsicht keine Schwierigkeiten und die sensomotorische Hirnrinde kann als funktionstüchtig angesehen werden. Die vorliegenden Ergebnisse enthalten einige Hinweise dafür, daß auch die frühzeitige Lähmung der Aufsetzreflexe, wie sie unter Luminal oder Chloralhydrat beobachtet werden kann, in erster Linie auf eine Inaktivierung der Rindenfunktion zurückgeführt werden muß. Die genannten Narkotica verhalten sich nämlich in ihrer Wirkung auf die „Rindenreflexe" und die Stellreflexe nach Magnus wie die Cyanide, die zunächst das Großhirn ausschalten. Der neuronale Aufbau der Reflexe und die Anzahl der in den Reflexmechanismus eingeschalteten Synapsen kommen hier als bestimmende Faktoren für die Empfindlichkeit der Stellreflexe und die Reihenfolge ihres Ausfalls weniger in Betracht, da das Myanesin als typischer Vertreter der „Interneuronengifte" ein vollkommen anderes Wirkungsbild besitzt.

Summary

The action of drugs (Atropine, Chlorpromazine, Cyanides, Morphine, Myanesine, Narcotics and Physostigmine) on the hopping and placing reactions of cats (described by Rademaker) have been tested. There is further evidence that the placing reactions are depending functionally on the sensorimotor cortex. The combined examination of the placing reactions and the righting reflexes (described by Magnus) may be used for the investigation of action of drugs on the cerebral cortex and the midbrain.

Literatur

Bard, P., and C. M. Broocks: Res. Publ. Ass. Nerv. Ment. Dis. **13**, 107 (1934). — Bard, P.: Arch. Neurol. Psychiat. **30**, 40 (1933). — Berger, F. M., et T. E. Lynes: Arch. internat. Pharmacodynamic C, No. 3—4, 401 (1955). — Bernsmeier, A., u. K. Siemon: Schweiz. med. Wschr. **1953**, 210. — Dasgupta, S. R., and

G. Werner: Brit. J. Pharmacol. **9**, 389 (1954). — Dasgupta, S. R., et G. Werner: Arch. internat. Pharmacodynamic C, No. 3—4, 409 (1955). — Dusser de Barenne, J. G.: Handb. Neurol. II. 1937. — Flury, F., u. W. Heubner: Biochem. Z. **95**, 249 (1919). — Fulton, J. F.: Physiologie des Nervensystems, Stuttgart: Enke 1952. — Girndt, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **167**, 90 (1932). — Girndt, O.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 142 (1936). — Hennemann, E., A. Kaplan and K. Unna: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **97**, 331 (1949). — Hennemann, E., and J. Scherrer: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **97**, 342 (1949). — Leimdorfer, A.: Arch. internat. Pharmacoldynamic **76**, 153 (1948). — Luco, J. V., and J. Marconi: J. Pharmacol. a. Exper. Ther. **95**, 171 (1949). — Magnus, R.: Körperstellung. Berlin: Springer 1924. — Magoun, H. W.: Physiologic. Rev. **30**, 459 (1950). — Rademaker, G. G. J.: Das Stehen. Berlin: Springer 1931. — Schaefer, K.-P.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 505 (1955). — Scheler, F.: Diss. Göttingen 1954. — Schoen, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **181**, 62 (1936). — Taverner, D.: Brit. J. Pharmacol. **7**, 655 (1952). — Ward, A. A.: J. of Neurophysiol. **10**, 89 (1947). — Woolsey, C. N., and P. Bard: Amer. J. Physiol. **116**, 165 (1936).

Dr. K.-P. Schaefer, Göttingen, Pharmakol. Inst. d. Univ.

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 566—575 (1956)

Aus dem Institut für animalische Physiologie der Universität Frankfurt a. M.

Die Bedeutung der Capillardruckmessung für die Beurteilung der Wirkung sog. capillarabdichtender Substanzen

Von

W. Schroeder, F. Gersmeyer und H. Freund

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Februar 1956)

Um die Permeabilität von Capillaren und Organzellen herabzusetzen, werden in der Klinik vor allem Calcium- und Rutinpräparate verwendet, deren Wirkungsmechanismus bisher jedoch noch nicht sichergestellt ist.

Neben einer großen Anzahl experimenteller Befunde und klinischer Beobachtungen über die „abdichtende" Wirkung dieser Substanzen konnte nur für das Calcium ein direkter Einfluß auf die Funktion der intercellularen Kittsubstanz der Capillaren nachgewiesen werden (Chambers u. Zweifach). Auch der membranabdichtende Effekt des Rutins soll durch Einwirkung auf die Kalk-Eiweißverbindungen der Zellgrenzflächen zustandekommen. Doch wird die Wirkung weiterhin auf eine Hemmung der Hyaluronidase sowie die Beeinflussung oxydoreduktiver Prozesse beiderseits der Membran zurückgeführt, deren Art und Größe die Durchlässigkeit einer Membran beeinflussen können (Lit. s. Kühnau).

Eigenartigerweise wird als Ursache der abdichtenden Wirkung dieser Präparate eine Gefäßwirkung (im Sinne einer den Stoffaustausch in den Capillaren hemmenden Kreislaufumstellung) nur selten diskutiert oder sogar auf Grund tierexperimenteller Untersuchungen abgelehnt. An Katzen und Kaninchen in Urethannarkose fanden Tainter u. Deventer nach subcutaner Calciuminjektion meist eine Blutdrucksenkung und schlossen daraus, daß die entzündungs- und exudationshemmende Calciumwirkung auf einem verminderten Filtrationsdruck beruhe. Diese Ansicht wurde jedoch von Rothlin u. Schalch[2] abgelehnt, weil sie am nicht narkotisierten Leersum-Kaninchen regelmäßig einen Blutdruckanstieg nach Calciumzufuhr beobachteten. Die Blutdrucksteigerung scheint aber nicht durch eine allgemeine Gefäßverengung zustande zu kommen, da im Tierversuch auch Gefäßerweiterungen — Haut-Muskelgebiet, Niere und Splanchnicusgebiet der Katze (Schretzenmayr), Kaninchenohr (Rothlin u. Schalch[2]), hintere Katzenextremität bei intraarterieller Injektion (Rothlin u. Cerletti[1]) — beobachtet worden sind. Da nach Ansicht der Autoren die beobachteten Kreislaufumstellungen nur im Sinne einer Filtrationserhöhung wirksam gewesen sein könnten, wurde eine den Stoffaustausch durch die Capillarwand hemmende Kreislaufumstellung als Ursache der abdichtenden Calciumwirkung abgelehnt. Auch die Rutinwirkung wurde nur auf eine Beeinflussung der Membranpermeabilität, nicht aber der Durchblutung zurückgeführt, da dem Rutin jede vasomotorische Wirkung fehle (Haley, Clark u. Geissman).

Wenn auch besondere klinische Beobachtungen z. B. bei Nephrose, Graviditätstoxikose, Glaucom, bei Röntgenschädigungen, Erfrierungen

usw. eine echte membranabdichtende Wirkung des Rutins oder der Calciumsalze sehr wahrscheinlich machen [dabei soll dahingestellt bleiben, ob diese Wirkung spezifisch oder (besonders beim Rutin) unspezifisch ist in dem Sinne, daß dieser Wirkstoff an „gewissen biologischen Fundamentalprozessen angreift und für jede lebende Zelle unentbehrlich ist" (KÜHNAU)], so kann doch, wie eigene Untersuchungen erweisen werden, nicht ausgeschlossen werden, daß die „membranabdichtende" Calcium- und Rutinwirkung wenigstens teilweise durch eine Capillarwirkung zustande kommt. Beide Stoffe senken nämlich den Capillardruck in den Gefäßen der Extremität des wachen Hundes und verringern die periodischen Druckänderungen in den Capillaren, d. h. sie können auf diese Weise den durch Diffusion und Filtration zustande kommenden Stoffaustausch durch die Capillarwand drosseln. Da die Methoden zum Nachweis einer Permeabilitätsänderung zumeist nicht spezifisch sind, ergibt sich hieraus, daß bei der Beurteilung von angeblich membranabdichtenden Substanzen nicht nur eine Exsudationshemmung, sondern auch eine fehlende Beeinflussung des Gefäßsystemes nachgewiesen werden muß.

Methodik

Alle Versuche wurden an wachen Carotisschlingenhunden durchgeführt, bei denen fortlaufend der Blutdruck an der Carotisschlinge (SCHROEDER[1]), der Femoralispuls und die Capillardruckänderungen in der vorderen Extremität registriert wurden. Für die Capillardruckregistrierung wurde das Vorderbein in ein plethysmographenartiges Gerät („Pressograph") eingeführt, dessen Flüssigkeit zu Versuchsbeginn auf einen Druck von 35 mm Hg eingestellt wurde (SCHROEDER[2]). Hierdurch wurde erreicht, daß die Wände der Blutgefäße mit einem Druck unter 35 mm Hg, d. h. die Capillaren entspannt wurden, so daß sich ihr Innendruck unmittelbar auf die umgebende Flüssigkeit übertragen konnte. Die fortlaufend registrierten Druckschwankungen entsprachen damit den Änderungen des über die ganze eingeschlossene Extremität integrierten Capillardruckes und der Capillardurchblutung, da in den Haargefäßen die Druck- und Durchströmungsänderungen parallel verlaufen. Schlag- und Minutenvolumen sowie peripherer und elastischer Gefäßwiderstand wurden nach WEZLER u. BÖGER berechnet.

Versuche

I. Zentraler Kreislauf

1. Calcium („Calcium gluconicum" — Sandoz 20%, i.v. Einzelinjektionen von 100 mg/kg und i.v. Dauerinfusion von 13 mg/kg/min über 20—30 min).

Wie aus der Tab. 1 ersichtlich ist, kommt es unter der angegebenen Calcium-Dosierung zur Erhöhung des systolischen und diastolischen Blutdruckes von 130/92 auf 164/111 mmHg (Mittelwert aus fünf Einzelbestimmungen), die bei nur wenig veränderten Werten des Herzminutenvolumens und des elastischen Gefäßwiderstandes im wesentlichen durch einen vergrößerten peripheren Gefäßwiderstand bedingt sind.

2. Rutin („Birutan"-Merck, Dauerinfusion von 1,8 mg/kg/min, Infusionsdauer von 8—10 min).

Im Gegensatz zum Calciumeffekt sinkt der Blutdruck unter der Rutinwirkung von 119/79 auf 101/69 mmHg (Mittelwert aus vier Einzelbestimmungen) infolge Erniedrigung des elastischen und peripheren

Tabelle 1. *Beeinflussung der zentralen Kreislaufgrößen durch intravenöse Calcium-, Birutan- bzw. Soventolzufuhr*

	normal	Calcium	normal	Birutan	normal	Soventol
RR	130/92	164/111	119/79	101/69	126/100	130/99
Fr.	96	86,3	83	87	96	78
V_s	10,0	10,5	10,0	15,0	10,2	13,2
V_m	960	910	830	1310	980	1030
E′	8600	9200	7600	5450	6430	5900
W	9300	11800	8130	4850	8930	8500

RR = Blutdruck in mm Hg; Fr. = Herzfrequenz/min; V_s = Schlagvolumen in cm^3; V_m = Herzminutenvolumen in cm^3; E′ = elast. Gefäßwiderstand (dyn/cm^5);

$$W = \text{peripherer Gefäßwiderstand } \left(\frac{\text{dyn} \cdot \text{sec}}{\text{cm}^5}\right)$$

Gefäßwiderstandes bei gleichzeitig erhöhtem Herzminutenvolumen. Unter Rutinwirkung wird die respiratorische Arrhythmie verringert bzw. aufgehoben.

3. Antihistaminicum („Soventol"-Knoll, Dauerinfusion 0,5 mg/kg/min, Infusionsdauer 8—10 min).

In der gewählten Dosierung können keine sicheren Änderungen des zentralen Kreislaufes nachgewiesen werden.

II. Capillardruckänderungen in der vorderen Extremität

1. Calcium. Die Abb. 1 zeigt die Veränderungen des Blutdruckes (Carotisschlinge) und des Capillardruckes in der 6.—9. Minute nach langsamer i.v.-Injektion von 100 mg/kg Calcium gluconicum. Der mittlere Blutdruck ist unter Vergrößerung der Amplitude um 10 bis 15 mmHg angestiegen bei gleichzeitigem Abfall des Capillardruckes. Die normalerweise vorhandenen periodischen Capillardruckschwankungen mit einer Amplitude von 5—10 mmHg und einer Periodendauer von 2—5 min sind nach der Calciumzufuhr sehr stark verkleinert und können praktisch ganz aufgehoben sein. Nur gelegentlich und sehr vorübergehend steigt der Capillardruck um wenige Millimeter Quecksilber an.

2. Rutin. Während einer Birutan-Infusion von 1,8 mg/kg/min sinkt, wie bei der Calciumwirkung, der Capillardruck (um 3—5 mmHg). Im Gegensatz zur Calciumwirkung fällt aber der Blutdruck (um 10 bis 15 mmHg) bei gleichzeitiger Verringerung der Blutdruckamplitude.

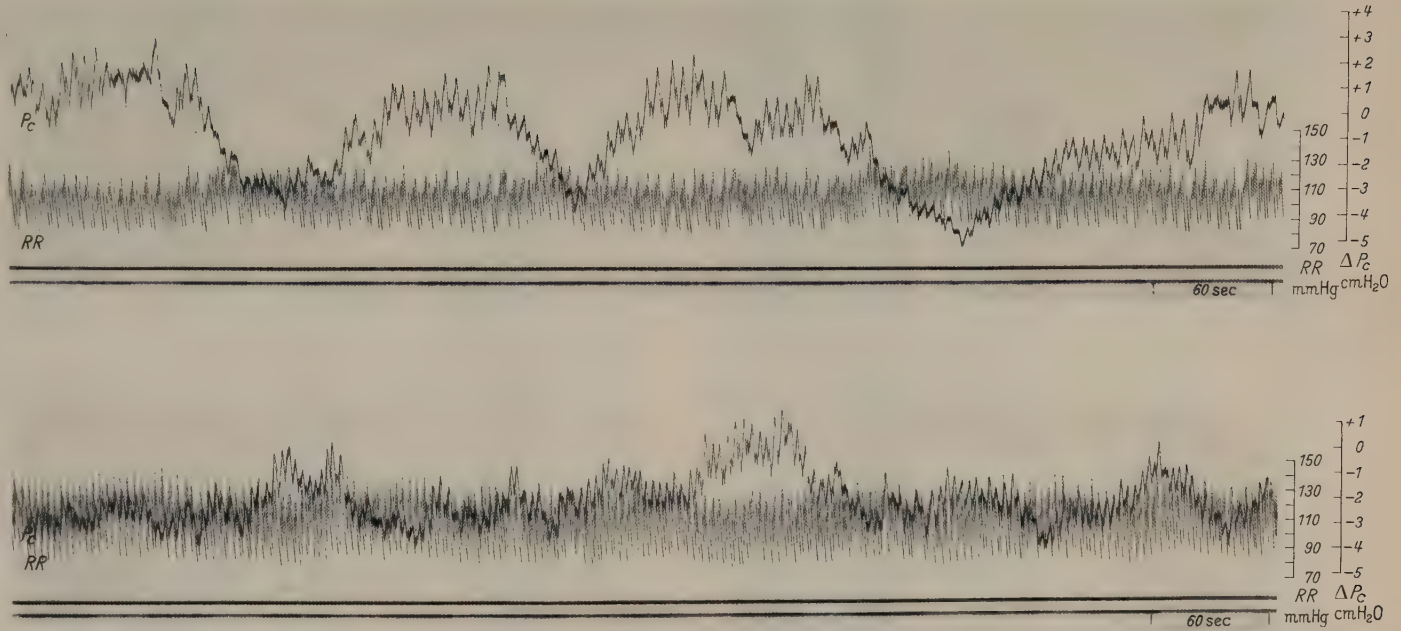


Abb. 1. Vers. v. 27. 2. 1955, Hund Tanja. Wirkung von Calcium gluconicum (i.v., 100 mg/kg) auf den Capillardruck der vorderen Extremität des wachen Hundes. *RR* Blutdruck (Carotisschlinge, mm Hg), P_c Capillardruck der vorderen Extremität (relative Änderungen, cm H_2O). — Oben: Normaler Kreislauf. Unten: Nach der Injektion des Calcium-Präparates; der zentrale Blutdruck ist angestiegen bei gleichzeitigem Abfall des Capillardruckes und Abschwächung der periodischen Capillardruckwellen (Vasomotionsdruckwellen)

3. Antihistaminicum. In der oben angegebenen Dosierung („Soventol"-Knoll) pflegt der Capillardruck um wenige Millimeter Quecksilber abzufallen.

III. Beeinflussung der capillarerweiternden Histaminwirkung durch Calcium, Rutin und Antihistaminica

Die i.v.-Injektion von 0,5 γ/kg Histamin läßt beim wachen Hund den Capillardruck bzw. die Capillardurchblutung der Extremitäten kräftig an-

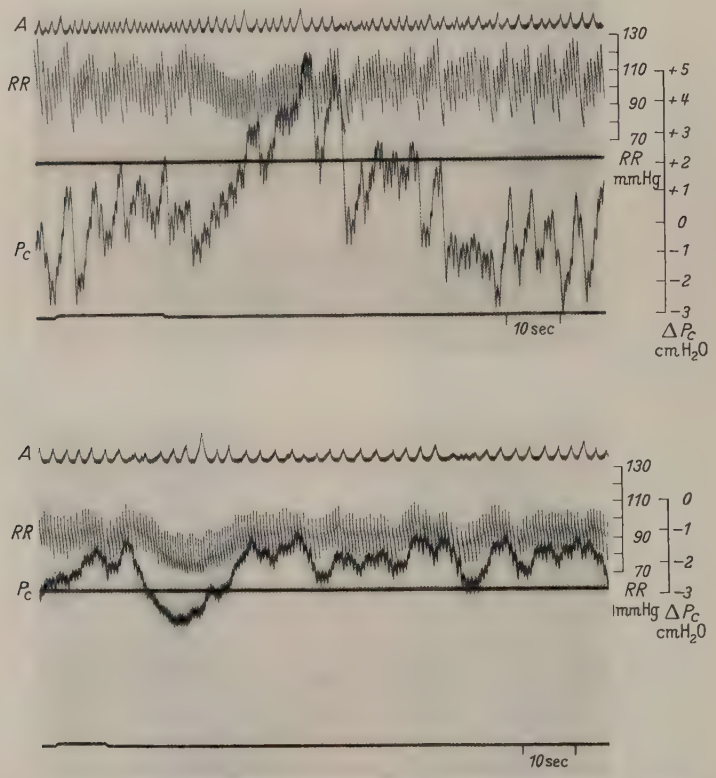


Abb. 2. Vers. v. 2. 2. 1955, Hund Blonda. Beeinflussung der Histaminwirkung (i.v. Einzelinjektion von 0,5 γ/kg) durch eine i.v. Birutandauerinfusion (16,5 mg/kg/min). *A* Atmung, *RR* Blutdruck (Carotisschlinge, mm Hg), P_c Capillardruck der vorderen Extremität (relative Änderunggen, cm H_2O). Injektionsmarke in der Zeitschreibung. — Oben: Normaler Kreislauf; Histamin steigert den Capillardruck und senkt den zentralen Blutdruck. Unten: Unter der Wirkung der Birutandauerinfusion sinken nach der Histamininjektion Capillardruck und zentraler Blutdruck

steigen. Der Capillardruckanstieg beträgt etwa 10—15 mmHg und dauert etwa 1—1½ min. In der Phase des Capillardruckanstieges sinkt der zentrale Blutdruck wegen der stärkeren Blutentnahme durch die Kreislaufperipherie um 5—10 mmHg ab. Diese Wirkung wird nicht nur durch

die gleichzeitige Zufuhr eines Antihistaminicums („Soventol"-Knoll, 0,5 mg/kg/min), sondern ebenso durch die gleichzeitige Calcium- bzw. Birutaninfusion (13 bzw. 1,8 mg/kg/min) stark abgeschwächt. Während einer Dauerinfusion von 16,5 mg/kg/min „Birutan" ist die Histaminwirkung nicht mehr nachweisbar, und man kann sogar eine dem Blutdruckabfall synchrone Capillarsenkung beobachten (Abb. 2).

IV. Registrierung der Ödembildung und der periodischen Durchströmungsschwankungen der hinteren Froschextremität

Bei einem frisch hergestellten Froschpräparat nach Laewen-Trendelenburg mit nicht ausgebohrtem Rückenmark zeigen sich periodische (im Abstande von 3—5 min) wiederkehrende Änderungen

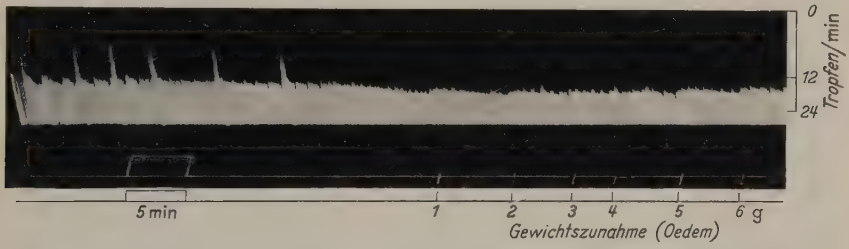


Abb. 3. Vers. v. 8. 7. 1955, Rana escul., ♂, 65 g, Perfusionspräparat der hinteren Extremität bei erhaltenem Rückenmark. Perfusionsflüssigkeit: Periston-Ringer 1 : 1, Perfusionsdruck 10 cm H_2O. Registrierung der Tropfenfolge (mit Ordinatenschreibung) und der Gewichtszunahme (Ödembildung). Beginn der Registrierung sofort nach Beendigung der Präparation

der Durchströmung, welche nach etwa 15—45 min verschwinden. Die an der Gewichtszunahme der Extremitäten gemessene Ödembildung pflegt, wie die Abb. 3 zeigt, erst nach Beendigung der Durchströmungsperiodik einzutreten bzw. schneller zuzunehmen.

Besprechung

Aus den mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß durch Zufuhr von Calciumverbindungen oder Rutinpräparaten a) der Capillardruck gesenkt, b) die periodischen Capillardruckschwankungen verringert und c) die capillarerweiternde Histaminwirkung abgeschwächt wird. Für den akuten Versuch, der ja im allgemeinen für den experimentellen Nachweis der membranabdichtenden Wirkung eines Pharmakons herangezogen wird, kann also nachgewiesen werden, daß zumindest ein Teil der „membranabdichtenden Wirkung" der untersuchten Präparate durch eine Funktionsänderung der terminalen Strombahn erklärt werden kann, welche sowohl die Rückresorptionsprozesse begünstigt als auch möglicherweise die Diffusionsvorgänge (infolge verlangsamter Blutströmung) einschränkt.

Nach unseren heutigen Vorstellungen kommt der Stoffaustausch durch die Capillarwand durch Diffusion und Filtration zustande. Nur die Diffusion, also der Austausch der Blutgase und der kleineren Moleküle wird von einer Verlangsamung des Blutflusses (bei Senkung des Durchströmungsdruckes) betroffen, weil hierdurch das osmotische Druckgefälle durch die Wand der Capillaren bereits an ihrem Anfangsteil ausgeglichen und ihr Endteil deshalb ungenutzt bleiben kann. Der durch Filtration-Rückresorption erfolgende Stoffaustausch hängt von der Höhe des Druckes in den Capillaren ab und muß daher der Frequenz und Amplitude der Vasomotionsdruckwellen proportional sein. Um daher die in einem Experiment beobachtete verminderte Flüssigkeitsfiltration auf eine herabgesetzte Permeabilität zurückführen zu können, ist der *gleichzeitige Nachweis eines konstanten oder zumindest nicht abgesunkenen Filtrationsdruckes, d. h. Capillardruckes notwendig.* Dieser Nachweis ist bisher aus methodischen Gründen nicht geführt worden.

Für physiologische Versuchsbedingungen lassen sich die quantitativen Beziehungen zwischen den Änderungen des Capillardruckes und der Filtrationsgeschwindigkeit nur schwer abschätzen. Zwar konnte von Landis[1] am Kaltblüter sowie von Pappenheimer u. Soto-Rivera am Warmblüter nachgewiesen werden, daß die Filtrationsgeschwindigkeit linear proportional mit dem effektiven Filtrationsdruck (entsprechend der Starlingschen Hypothese) ansteigt. Dies trifft jedoch nur für das isolierte tierische Präparat zu, während unter physiologischen Bedingungen, z. B. am intakten menschlichen Arm, die Filtrationsgeschwindigkeit mit Erhöhung des Filtrationsdruckes kontinuierlich abnimmt (Drury u. Jones; Landis u. Gibbon). Die Ergebnisse der Experimente Pappenheimers müssen jedoch wegen der indirekten Bestimmung bzw. Berechnung des Capillardruckes problematisch bleiben. Eine lineare Proportionalität zwischen dem effektiven Filtrationsdruck (= Druckdifferenz auf beiden Seiten der Capillarmembran abzüglich des kolloidosmotischen Druckes der Bluteiweißkörper) und der filtrierten Flüssigkeit läßt sich nur dann erwarten, wenn die filtrierende Fläche und deren Beschaffenheit konstant bleiben. Diese Voraussetzungen sind aber nur bei längere Zeit isolierten Organen mit ihren akkomodierten, d. h. maximal erweiterten Gefäßen gegeben, während unter physiologischen Bedingungen (keine Narkose, normale Gefäßinnervation, normale Sauerstoffspannung der Gewebe) die Größe der filtrierenden Fläche und deren Wanddicke von der Höhe des Capillardruckes abhängen. Wenn man einmal annimmt, daß in einem mittleren Capillardruckbereich eine lineare Beziehung zwischen dem Radius der Haargefäße und dem effektiven Gefäßinnendruck besteht (experimentelle Unterlagen scheinen hierüber noch nicht vorzuliegen), müßte mit der Abnahme des Capillardruckes auch die Filtrationsfläche um den prozentual gleichen Betrag wie der Capillardruck abnehmen, wobei von einer Beeinflussung der Gefäßlänge durch Druckänderungen abgesehen werden soll. Auf der anderen Seite wird bei relativ hohem Capillardruck und bereits weitgehend entfalteter Gefäßwand eine zusätzliche Drucksteigerung die filtrierende Oberfläche nicht weiter vergrößern bzw. die Filterdicke nicht weiter herabsetzen können. Die Dicke der Capillarwand ist ja ebenfalls eine Funktion des Gefäßinnendruckes. Wenn eine Capillare von einem äußeren Radius von 5 μ und einer Capillarwanddicke von 0,5 μ ihren Radius auf 3 μ verkleinert, müssen, wie kürzlich von Hutt u. Wick in analoger Weise für die Bronchien ausgeführt worden ist, Schichten und Bestandteile der Capillarwand infolge des Zusammenschiebens des Wandmateriales praktisch

doppelt so dick werden (0,94 μ), wobei die Durchlässigkeit etwa auf die Hälfte verringert werden dürfte. Wenn gleichzeitig durch diesen Vorgang die Poren und Kanäle in der Capillarwand länger und enger oder in ihrer Querschnittsform verändert werden, dann muß hierdurch der Durchtritt von Molekülen weiter behindert werden.

Diese Überlegungen zeigen, daß

1. eine lineare Abhängigkeit der Filtrationsgeschwindigkeit vom Gefäßinnendruck nur bei vollkommen akkomodierten Haargefäßen, nicht aber in mittleren Druckbereichen erwartet werden kann. Das Verhältnis von Gefäßinnendruck zu Filtrationsgeschwindigkeit muß daher mit ansteigendem Druck abnehmen, wie dies von Drury u. Jones sowie von Landis u. Gibbon[2] am intakten menschlichen Arm gefunden worden ist.

2. ohne Kontrolle des Capillardruckes die Wirkung einer Substanz auf die Capillarpermeabilität nicht beurteilt werden kann.

Die capillardrucksenkende Wirkung einer Substanz kann durch verschiedene Mechanismen zustande kommen. Erstens kann die Durchblutung des gesamten Capillarbettes infolge Arteriolenverengerung gedrosselt worden sein. Einen derartigen Mechanismus müssen wir bei der Calciumwirkung annehmen, weil gleichzeitig mit der Capillardrucksenkung der zentrale Blutdruck ansteigt. Zweitens kann der Capillardruck absinken, wenn die Kurzschlußdurchblutung auf Kosten der Capillardurchblutung erhöht wird. Ein derartiger Mechanismus liegt vielleicht der Rutinwirkung zugrunde, denn die nach Rutinzufuhr ermittelte Senkung des gesamten peripheren Strömungswiderstandes und die dadurch reflektorisch ausgelöste Herzminutenvolumensteigerung hat keinen Capillardruckanstieg in der Extremität (wie z. B. nach einer Histamininjektion) und damit auch keine Durchblutungssteigerung der nutritiven Gefäße zur Folge. Das vergrößerte Stromvolumen kann daher nur über Kurzschlußgefäße auf die venöse Seite gelangen. Diese Folgerung ist in unserem Falle aber nur dann erlaubt, wenn mit der Herzminutenvolumensteigerung auch die Extremitätendurchblutung zugenommen hat, was experimentell noch nicht nachgewiesen worden ist. Weiterhin wird der Capillardruck auch dann absinken, wenn unter der Rutinwirkung die gesamte Extremitätendurchblutung (im Gegensatz zur Durchblutungssteigerung anderer Organe) gedrosselt wird.

Wenn sich das Stromvolumen eines isolierten Organes (z. B. einer Extremität) unter der Wirkung einer Substanz, deren Einfluß auf die Capillarpermeabilität untersucht werden soll, nicht ändert, kann hieraus keine Konstanz des Capillardruckes gefolgert werden (Kuschinsky), weil die Kurzschlußdurchblutung auf Kosten der Capillardurchblutung gesteigert worden sein kann. Derartige Zustände lassen sich an der Extremität durch Acetylcholin erzielen.

Bei allen bekannten Versuchsanordnungen für den Nachweis der exsudationshemmenden Wirkung von Calcium- oder Rutinpräparaten läßt sich die beobachtete Wirkung nicht nur durch Änderung der Capillarmembraneigenschaften, sondern auch durch Änderung des Capillardruckes *und*

der Capillardurchblutung erklären. Dies gilt insbesondere für Durchströmungspräparate der hinteren Extremität von Säugetieren — Hunden, Katzen (Pappenheimer u. Soto-Rivera); Mäusen (Kuschinsky); Katzen (Wilbrandt u. Mitarb.) und Ratten (Ruhenstroth Bauer u. Kübler) —, bei denen die Flüssigkeitsbewegungen durch die Capillarwand an den Gewichtsänderungen der isolierten Extremitätenpräparate verfolgt werden. So läßt sich eine Abnahme der Ödembildung, wie sie von Kuschinsky an der Mäuseextremität unter Rutinwirkung gefunden worden ist, auf eine Abnahme des Filtrationsdruckes zurückführen, ohne daß man eine veränderte Gefäßpermeabilität postulieren müßte. Denn eine Capillardrucksenkung von 5 mmHg oder 16,5%, wie sie in den eigenen Versuchen gefunden worden ist, bedeutet nicht nur eine Verringerung der Filtrationsgeschwindigkeit um 16,5%, sondern infolge der Abnahme des Gefäßlumens außerdem eine Verkleinerung der filtrierenden Fläche um 16,5%. Zur Abnahme des Gefäßquerschnittes von 16,5% (von 8 μ auf 6,68 μ äußeren Durchmessers) kommt dann noch infolge der damit verbundenen Wanddickenzunahme (von 0,5 μ auf 0,65 μ) eine Verminderung der Permeabilität von etwa 13%. Bei dem Zusammenwirken dieser Faktoren lassen sich ohne Schwierigkeiten Änderungen des Flüssigkeitsdurchtrittes von 25—30%, wie sie von Kuschinsky gefunden worden sind, schon durch geringe Capillardruckänderungen erklären.

Bei normalem, zentral gesteuertem Arteriolengrundtonus erfolgt die feinere Anpassung des Capillar-, d. h. also des Filtrationsdruckes an die Bedürfnisse der Organe durch gewebsseitige Impulse. Als Ausdruck dieser Steuerung haben wir die periodischen Capillardruckänderungen anzusehen (Vasomotionswellen, Lit. siehe Schroeder[3]), welche nur bei normalem Arteriolengrundtonus vorhanden und an die Intaktheit des Nervensystemes gebunden sind. Jede Beeinträchtigung des Arteriolengrundtonus hebt die Wirkung der gewebsseitigen Impulse auf, und mit zunehmender Gefäßerweiterung erlöschen die periodischen Druckwellen. Aus diesem Grunde sehen wir an isolierten Extremitätenpräparaten ein fortschreitendes Ödem, dessen Entwicklung nur durch Infusionsflüssigkeiten mit übernormalem kolloidosmotischem Druck bzw. durch einen unter den physiologischen Wert gesenkten Capillardruck aufgehalten werden kann. Die Geschwindigkeit der Ödemzunahme in der isolierten Extremität ist während der Versuche nicht konstant, sie ist zwar unmittelbar nach der Präparation noch gering, nimmt aber kontinuierlich zu, um am Ende des Versuches aus mechanischen Gründen wieder abzunehmen. Mit der Ödembildung schwindet die Periodik der Capillardruck bzw. Durchblutungsänderungen, welche sich beim Frosch mit nicht ausgebohrtem Rückenmark noch mehrere Minuten nach der Präparation nachweisen lassen (Abb. 3). Nach Zerstörung des Nervensystems vermag

sich das Gewebe nicht mehr gegen den jetzt unphysiologisch hohen Filtrationsdruck zu schützen, und die Filtrationsgeschwindigkeit (d. h. die Geschwindigkeit der Ödemzunahme) strebt dann einem jetzt konstanten Maximalwert zu. Dies ist auch der Grund dafür, daß man „sichere und vergleichbare Ergebnisse erst nach sorgfältiger Entfernung des Rückenmarks erhält" (Ruhenstroth-Bauer u. Kübler).

Bekanntlich wird die Histaminwirkung sowohl durch Calcium- (Cattaneo) als auch durch Rutinpräparate (Raiman, Later u. Necheles; Wilson u. de Eds) abgeschwächt. Hierbei soll es sich um eine noch unbekannte indirekte Wirkung handeln, weil weder Calcium noch Rutin zu den Histaminantagonisten gehören. Die eigenen Versuche lassen vermuten, daß die Ursache der abgeschwächten Histaminwirkung in der verminderten Durchströmung der Capillaren und dem damit verminderten Histaminangebot zu suchen ist.

Zusammenfassung

Calcium- und Rutinpräparate senken in der Extremität des wachen Hundes den Capillardruck und vermindern Amplitude und Frequenz der periodischen Capillardruckschwankungen (Vasomotionsdruckwellen). Hierdurch wird der Stoffaustausch durch die Capillarwand herabgesetzt, da mit der Capillardrucksenkung der effektive Filtrationsdruck und die filtrierende Oberfläche kleiner und die Gefäßwände dicker werden. Ohne Kontrolle des Funktionszustandes des Capillarbettes kann daher die Wirkung sogenannter capillarabdichtender Substanzen nicht auf eine herabgesetzte Capillarpermeabilität zurückgeführt werden.

Literatur

Cattaneo: zit. nach Calcium-Monographie (Sandoz) 1952, S. 37. — Chambers, R., and W. Zweifach: J. Cellul. a. Comp. Physiol. **15**, 255 (1940). — Drury, A. N., and N. W. Jones: Heart **14**, 55 (1927). — Haley, T. J., W. G. Clark and T. A. Geisman: Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **65**, 202 (1947). — Hutt, G., u. H. Wick: Pflügers Arch. **258**, 311 (1954). — Kühnau, J.: Klin. Wschr. **1949**, 294; Mercks Jahresberichte 1947/48. — Kuschinsky, G.: Klin. Wschr. **1949**, 317. — [1] Landis, E. M.: Amer. J. Physiol. **82**, 217 (1927). — [2] Landis, E. M., and J. Gibbon: J. Clin. Invest. **11**, 62 (1932). — Pappenheimer, J. R., and A. Soto-Rivera: Amer. J. Physiol. **152**, 471 (1948). — Raiman, R. J., E. R. Later and H. Necheles: Science (Lancaster, Pa.) **106**, 368 (1947). — [1] Rothlin, E., u. A. Cerletti: Cardiologia (Basel) **21**, 735 (1952). — [2] Rothlin, E., u. W. R. Schalch: zit. nach Calcium-Monographie (Sandoz) 1952, S. 48. — Ruhenstroth-Bauer, G., u. W. Kübler: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **225**, 287 (1955). — Schretzenmayr, A.: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **116**, 630 (1931). — [1] Schroeder, W.: Arch. Kreislaufforsch. **15**, 24 (1949). — [2] Schroeder, W.: Z. Biol. **103**, 389 (1950). — [3] Schroeder, W.: Kapillaren und Interstitium, S. 65. Thieme 1955. — Tainter, M. L., and W. Deventer: J. Amer. Med. Assoc. **94**, 546 (1930). — Wezler, K., u. A. Boeger: Erg. Physiol. **41**, 292 (1939). — Wilson, R. H., and F. de Eds: Science (Lancaster, Pa.) **107**, 369 (1948). — Wilbrandt, W., P. Schmutziger, A. Baltzer u. H. Wüthrich: Helvet. physiol. Acta **12**, C58 (1954).

Professor Dr. W. Schroeder, Frankfurt/Main, Institut f. animalische Physiologie

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 576—577 (1956)

Aus dem Institut für animalische Physiologie der Universität Frankfurt a.M.

Ein neues Dauerinfusionsgerät für tierexperimentellen und klinischen Gebrauch

Von
W. Schroeder

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 3. Februar 1956)

Die sowohl in tierexperimentellen Laboratorien als auch in der Klinik gebräuchlichsten Dauerinfusionsgeräte bestehen aus einer motorgetriebenen Glasspritze mit Getriebeuntersetzung. Sie haben die Nachteile, daß

1. die Infusionsgeschwindigkeit nur stufenweise, nicht kontinuierlich geregelt werden kann. Besonders für Untersuchungen am wachen Menschen ist aber eine kontinuierliche Regelung unbedingt erforderlich, da z. B. bei der meist gebräuchlichen Zahnraduntersetzung von 1 : 2 (= Verdoppelung der Infusionsgeschwindigkeit) die Wirkung oft entweder zu schwach oder bereits zu stark ist,

2. die Infusion beim Nachfüllen der Spritze unterbrochen werden muß,

3. die Spritzen nach längerem Gebrauch besonders für intraarterielle Infusionen undicht werden und

4. zur Sterilisation die einzelnen Teile der Spritze auseinandergenommen werden müssen.

Diese Nachteile sind in der folgenden Konstruktion vermieden worden.

Ein Motor mit konstanter Umdrehungszahl treibt über ein Zahnradvorgelege eine Excenterscheibe (*E*), welche über eine Stange (*St*) den Kolben einer kleinen Metallpumpe (Kolbendurchmesser 3 mm) 36mal in der Minute hin- und herbewegt. Der Kolbenhub kann mittels der Einstellscheibe (*S*) für Infusionsgeschwindigkeiten zwischen 0,1 und 1,4 cm^3/min kontinuierlich verändert werden. Die augenblickliche Infusionsgeschwindigkeit kann jederzeit auf der Einstellscheibe direkt (ohne Umrechnung oder Tabelle) abgelesen werden. Gleichzeitig steuert die Excenterscheibe über die Ventilstange (*V*) einen konisch eingeschliffenen, ständig unter Federdruck stehenden Metallhahn (Ventil), der den Weg beim Ansaugen der Spritze zum Flüssigkeitsvorratsgefäß (*G*) und beim Entleeren der Spritze zum Infusionsschlauch mit Nadel freigibt. Der Metallhahn ist und bleibt wegen seiner konischen Form

gegen einen Überdruck von 300 mm Hg dicht. Die Abdichtung der Metallspritze wird durch eine Stopfbuchse mit Bunagummiring erreicht. Das Vorratsgefäß hat an seinem Boden ein einfaches (zentral durchbohrtes) Gewinde und kann deshalb schnell gegen Vorratsgeräte verschiedener Form und Größe (z. B. graduierte Pipetten) ausgetauscht

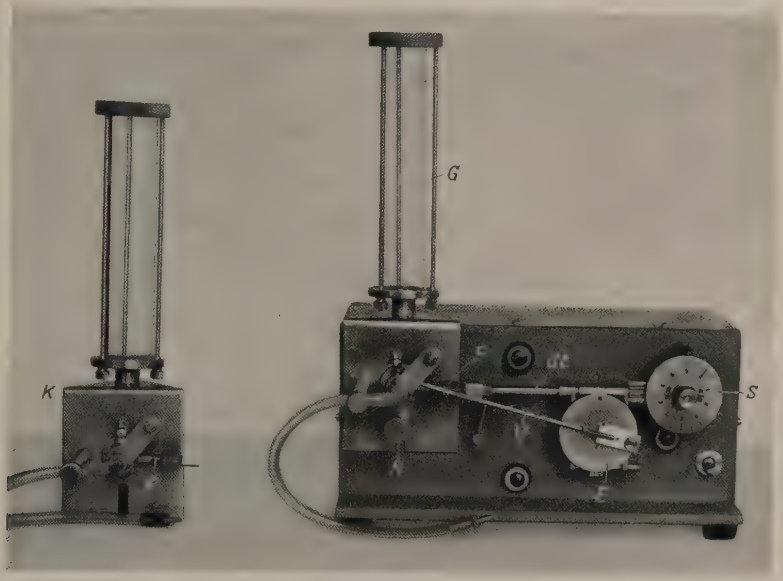


Abb. 1

werden. Zur Sterilisation (im gespannten Wasserdampf) wird der gesamte Infusionskopf (*K*) mit Vorratsgefäß und Infusionsschlauch nach Lösen einer einzigen Rändelschraube (*R*) vom Antriebsaggregat abgehängt (siehe linken Teil der Abbildung).

Das Gerät wurde vom Mechanikermeister G. Schwebel, Frankfurt, Institut für animalische Physiologie der Universität, angefertigt.

Prof. Dr. W. Schroeder, Frankfurt a. M., Institut für animalische Physiologie

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, 578—595 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

Die Beeinflussung der renalen Wasser- und Salzausscheidung normaler und hypophysektomierter Ratten durch Nebennierenrindenhormone

Von
H. Brunner, G. Kuschinsky und G. Peters* **

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 4. Februar 1956)

Die Nebennierenrindenunterfunktion geht immer mit einer Störung der Wasserausscheidungsfähigkeit einher; C. H. Beatty, R. M. Boeck u. R. D. Peterson (1954) haben sogar einen auf dieser Tatsache aufgebauten empfindlichen Test für die Vollständigkeit der Adrenalektomie bei der Ratte ausgearbeitet. Eine ähnliche Störung der Wasserausscheidungsfähigkeit verursacht der Ausfall des Hypophysenvorderlappens. Es schien interessant zu untersuchen, ob und wie weit die Störungen des Wasser- und Salzhaushaltes hypophysenloser Tiere mit denen adrenalektomierter Tiere übereinstimmen, oder ob der Ausfall anderer als der adrenocorticotropen Hypophysenfunktion eine Rolle spielt. Weiterhin erschien es wichtig, den Einfluß der zur Substitutionstherapie bei hypophysenlosen und nebennierenlosen Tieren verwendeten hohen Dosen der Nebennierenrindenhormone auf die Wasser- und Mineralausscheidung normaler Tiere zu untersuchen, um pharmakologische Wirkungen der Steroide von ihren Substitionseffekten abtrennen zu können.

Methodik

1. Hypophysektomierte Ratten. Vor der Operation wurden die Tiere an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Zu diesem Zweck wurden sie zweimal im Abstand von einer Woche in Diuresekäfige gesetzt und erhielten durch die Magensonde zweimal je 10 ml Wasser; außerdem wurden ihnen zweimal je 1—3 ml isotonische Kochsalzlösung s.c. injiziert. — Hypophysektomie an ungefähr 150 g schweren männlichen

* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen wurden von einem von uns (H. B.) als Kurzreferat der Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Graz (1955) vorgelegt.

und weiblichen Ratten parapharyngeal in Äthernarkose nach D. J. Ingle (1942)[1]. Nach der Operation für die ersten 3 Tage neben Wasser ad lib. 10%ige Saccharoselösung, vom 4. Tag ab ständig als Trinkflüssigkeit Wasser und 2%ige Kochsalzlösung zur freien Auswahl. Die Tiere wurden zu je 6—7 in einem Stall bei 28° C 12—14 Wochen gehalten. Zum Versuch wurden diejenigen ausgewählt, die eine deutliche Genitalatrophie zeigten (♂) und 8 Wochen nicht an Gewicht zugenommen hatten (♂ und ♀). Ratten eines Stalles wurden dabei nach Zufallskriterien den einzelnen Behandlungsgruppen zugeteilt.

Je 8 Tiere erhielten

1. 25 mg/kg Cortisonacetat-Kristallsuspension[1] täglich s.c.,
2. 20 mg/kg Desoxycorticosteronacetat (DOCA) in Öl s.c. täglich[1],
3. 0,5 mg Thyroxin s.c. täglich[2],
4. 0,5 ml physiol. Kochsalzlösung täglich s.c.

Am 5. und 10. Tag dieser Behandlung wurde die maximale Diurese (siehe unten) bei Wasserbelastung, am 12. Tag bei Belastung mit isotonischer Kochsalzlösung bestimmt. Die letzte Hormongabe wurde dabei jeweils etwa 9 Std vor Versuchsbeginn verabreicht und den Ratten gleichzeitig das Futter entzogen, während sie Wasser und 2%ige NaCl-Lösung ad lib. weiter erhielten.

Nach Abschluß der Versuche wurde die Hypophysektomie auf Vollständigkeit autoptisch kontrolliert.

2. Normale Ratten. Die Versuchstiere wurden zunächst in der beschriebenen Weise an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Je 10 männliche und 10 weibliche Ratten erhielten die oben angegebene Dosis Cortison oder DOCA oder phys. NaCl-Lösung täglich s.c. Maximaldiuresen wurden zu den gleichen Zeitpunkten wie bei den hypophysektomierten Tieren bestimmt. Diese Tiere erhielten zur freien Auswahl dauernd Wasser und phys. NaCl-Lösung bei sonst gleichen Bedingungen wie die Hypophysenlosen.

3. Bestimmung der maximalen Diuresegeschwindigkeit. Zur Harnsammlung wurden die Ratten einzeln in Metallgefäße mit nicht angreifbaren Metallbodensieben über Glastrichter gesetzt.

Als Maß der renalen Ausscheidungsfähigkeit für Wasser wurde die maximale Diuresegeschwindigkeit gewählt: In früheren Untersuchungen an normalen Ratten hatte sich gezeigt, daß die maximale Geschwindigkeit der renalen Wasserausscheidung mit Steigerung der oralen Wassergabe (Magensonde) bis zu einer bestimmten Größe der letzteren zunimmt und bei weiterer Steigerung gleichbleibt. Die kritische oral gegebene Wassermenge beträgt bei Zufuhr von Wasser ungefähr 10 ml/Ratte, bei Zufuhr von isotonischer Kochsalzlösung ungefähr 6—7 ml/Ratte. Sie ist nicht signifikant abhängig vom Körpergewicht oder vom Geschlecht der Tiere (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956b).

Zur Bestimmung der maximalen Diuresegeschwindigkeit einer Ratte muß daher mit der Magensonde eine Wassermenge gegeben werden, die groß genug ist, um während der Beobachtungszeit eine Wasserbelastung oberhalb der kritischen Grenze aufrechtzuerhalten. Als maximale Diuresegeschwindigkeit bezeichnen wir die größte innerhalb einer Gesamtbeobachtungszeit von 2 Std auftretende Wasserausscheidungsgeschwindigkeit.

---

[1] Wir danken Dr. L. Ther und Fräulein Münch vom Pharmakologischen Laboratorium der Farbwerke Hoechst für Unterweisung in der Technik des Eingriffs.

[2] Wir danken den Farbwerken Hoechst, der Ciba AG., Wehr/Baden, und der Schering AG., Berlin für die freundliche Überlassung größerer Versuchsmengen von DOCA und Cortison und der Deutschen Hoffmann La Roche AG., Grenzach/Baden für Versuchsmengen von Thyroxin.

Zur Bestimmung der maximalen Diuresegeschwindigkeit gaben wir normalen Ratten zu Versuchsbeginn im Abstand von 10 min 10 und 8 ml destilliertes Wasser durch die Magensonde. Der Urin der ersten 20 min von der 2. Wassergabe ab wurde verworfen. Von diesem Zeitpunkt an wurde alle 10 min nach Blasenentleerung durch Druck auf den Unterbauch und Zug am proximalen Schwanzende 2 Std lang die Urinmenge abgelesen. Aus diesen 10 min-Werten einer Ratte wurde der höchste ohne Rücksicht auf die zeitliche Lage im Versuch ausgewählt. Um die Möglichkeit einer Verfälschung dieses Maximalwerts durch unvollständige Blasenentleerung in der Vor- oder in der Maximal-Periode auszuschließen, wurden zu diesem maximalen 10 min-Wert die Diuresen der beiden unmittelbar vorangehenden und der folgenden 10 min-Periode hinzugezählt; der erhaltene Wert wurde schließlich in Milliliter pro Stunde umgerechnet.

Die Bestimmung der maximalen Diuresegeschwindigkeit nach oraler Gabe von isotonischer NaCl-Lösung wurde in der gleichen Weise vorgenommen; die gegebene Flüssigkeitsmenge betrug hier 7 + 5 ml.

Hypophysenlose Ratten erhielten auch zur Bestimmung der maximalen Diuresegeschwindigkeit nach Gabe von Wasser nur 7 + 5 ml destilliertes Wasser, weil größere Wassermengen Störungen des Allgemeinzustandes und Durchfälle hervorriefen. Wegen der geringen Diurese der hypophysenlosen Tiere lag trotzdem die im Körper verbliebene zusätzliche Wassermenge während der ganzen Versuchsdauer über der kritischen Grenze.

4. Bestimmung der Ionen. In dem von der 30.—150. min nach der ersten Wässerung gesammelten Urin wurde Na^+ und K^+ flammenphotometrisch, Cl' nach der Methode von G. Kuschinsky u. H. Langecker (1947) bestimmt. Eine Umrechnung der ausgeschiedenen Ionenmenge auf Kilogramm Körpergewicht wurde unterlassen, da sich zeigte, daß eine derartige Transformation die Streuung erhöht und somit eine Abhängigkeit der Werte vom Körpergewicht nicht anzunehmen ist (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der Zweigruppenstreuungszerlegung nach G. W. Snedecor (1950), wobei eine Wahrscheinlichkeit für die Übereinstimmung zweier Mittelwerte $< 0{,}05$ als signifikanter, eine Wahrscheinlichkeit $< 0{,}01$ als hochsignifikanter Unterschied gewertet wurde.

Ergebnisse

Die maximale Diuresegeschwindigkeit normaler Ratten nach der angegebenen Wässerung beträgt 7,18 $\pm$ 0,26 (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) ml/Ratte/Std. (Als Durchschnittswert von 93 Tieren aus 6 Versuchstagen während eines Zeitraumes von $1^1/_4$ Jahren). Die Streuung der Werte zwischen verschiedenen Versuchstagen ist nicht größer als die Streuung zwischen den Ratten eines Versuchstages, Eine 5tägige Behandlung mit DOCA oder Cortison bedingt bei *normalen* Versuchsratten eine eindeutige Steigerung der Geschwindigkeit der maximalen Diurese gegenüber den Kontrollen, die täglich 0,5 ml physiol. Kochsalzlösung s. c. erhalten haben. Allerdings liegt auch die maximale Diuresegeschwindigkeit dieser Kontrollen signifikant höher als der Durchschnittswert überhaupt nicht „behandelter" Tiere.

Die Steigerung der maximalen Diuresegeschwindigkeit bei den Kontrolltieren kann nicht auf einem Gewöhnungseffekt an die orale Wassergabe beruhen, da wiederholte Wasserbelastungen in Abständen von 3—8 Tagen nicht zu einer Steigerung der

Maximaldiurese führen (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956b). Ob die tägliche s.c. Injektion einer kleinen Menge physiol. Kochsalzlösung oder das s.c. Stechen an sich hierfür verantwortlich sind, muß näher untersucht werden.

Nach 12tägiger Behandlung ist die maximale Diuresegeschwindigkeit der mit DOCA behandelten Tiere (sowie die der Kontrollen) wieder auf den Vorbehandlungswert abgesunken. Nur bei den mit Cortison behandelten Tieren *bleibt* die maximale Diuresegeschwindigkeit eindeutig gesteigert.

Die Ausscheidungsgeschwindigkeit *hypophysenloser* Ratten nach Wasserbelastung (Abb. 1) liegt wesentlich niedriger und wird durch 5tägige DOCA-Behandlung erheblich, durch Cortison innerhalb derselben Zeit signifikant mehr gesteigert. Bei 10tägiger Behandlung bringt Cortison keine weitere Besserung mehr, während unter DOCA-Medikation nunmehr der Wert Cortison-behandelter Tiere erreicht wird.

Die durch DOCA oder Cortison gesteigerte Maximaldiurese erreicht in keinem Fall die Normalwerte unbehandelter intakter Tiere.

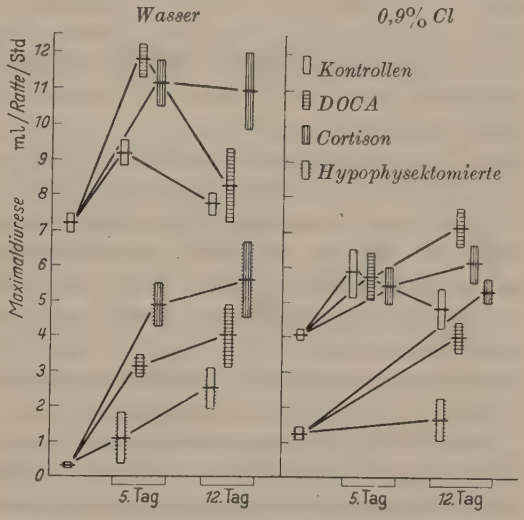


Abb. 1. Maximale Diuresegeschwindigkeit normaler und hypophysektomierter Ratten unter Nebennierenrindensteroidbehandlung. Der jeweilige Mittelwert ist durch einen starken Querstrich bezeichnet, von ihm ist nach oben und unten jeweils eine Standardabweichung des Mittelwerts ($s_{\bar{x}}$) aufgetragen. Normalwerte: 7,18 ± 0,26 ml/Ratte/Std (n = 93) für unbehandelte Normaltiere, 0,33 ± 0,05 ml/Ratte/Std (n = 17) für unbehandelte hypophysektomierte Tiere bei Wässerung mit Wasser; 4,06 ± 0,16 ml/Ratte/Std (n = 89) für unbehandelte Normaltiere, 1,24 ± 0,19 ml/Ratte/Std (n = 19) für hypophysektomierte Ratten bei Wässerung mit isotonischer Kochsalzlösung. Die Anzahl der Tiere in den behandelten Gruppen beträgt jeweils 8, mit Ausnahme der cortisonbehandelten hypophysektomierten Ratten nach 12tägiger Behandlung (hier n = 6). „5. Tag" = 5. Tag der Steroidbehandlung; „12. Tag" = 10.—12. Tag der Steroidbehandlung

Der Durchschnitt der maximalen Diuresegeschwindigkeit *normaler* Ratten — an 98 Tieren in 6 Versuchen an 6 verschiedenen Tagen während $1^1/_4$ Jahren ermittelt — beträgt nach Wässerung mit 7 und 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung 4,06 ± 0,16 ml/Ratte/Std. Die Ausscheidungsgeschwindigkeit nach 5tägiger Behandlung mit DOCA oder Cortison unterscheidet sich nicht von derjenigen der Kontrolltiere. Es muß allerdings hervorgehoben werden, daß auch hier die Kontrolltiere, die lediglich täglich 0,5 ml physiol. NaCl-Lösung s. c. erhalten haben, eine höhere

Ausscheidungsgeschwindigkeit als ganz unbehandelte Tiere erreichen und daß diese auch hier bei weiterer Fortsetzung der „Behandlung" am 12. Tag nicht mehr vorhanden ist. — Erst nach 12tägiger Behandlung läßt sich bei den mit DOCA behandelten, nicht aber bei den mit Cortison behandelten Normaltieren, eine Steigerung der Wasserausscheidungsgeschwindigkeit nach Gaben von isotonischer Kochsalzlösung erzielen: Die maximale Diurese liegt jetzt ebenso hoch wie die unbehandelter Tiere, die einen Wasserstoß erhalten haben (7,13 $\pm$ 0,53 bzw. 7,18 $\pm$ 0,26 ml/Ratte/Std). Es läßt sich nicht entscheiden, ob die erreichte Diurese einer echten Wasserdiurese entspricht, die sich ja bekanntlich bei normalen Ratten, im Gegensatz zum Hund, durch orale Gaben von isotonischer Kochsalzlösung nicht erzielen läßt (H. Brunner, G. Kuschinsky u. G. Peters 1956a).

Die Ausscheidungsgeschwindigkeit *hypophysenloser* Ratten nach Gabe von isotonischer Kochsalzlösung liegt mit 1,24 $\pm$ 0,19 ml/Ratte/Std wesentlich niedriger als der Wert der Normaltiere. Jedoch scheiden diese Tiere isotonische Salzlösung schneller aus als Wasser. Sie gleichen damit den adrenalektomierten Tieren, für die W. R. Bristol u. V. A. Drill (1952) eine Abhängigkeit der Wasserausscheidung vom Salzgehalt der gegebenen Flüssigkeit nachgewiesen haben.

Nach 12tägiger Behandlung bewirkt sowohl DOCA als auch Cortison (dieses signifikant mehr) eine Steigerung der Ausscheidungsfähigkeit. Die Steroide normalisieren die maximale Diuresegeschwindigkeit nach Gabe von 0,9% NaCl vollständig. Infolgedessen ist bei mit DOCA oder Cortison behandelten hypophysenlosen Ratten die maximale Diuresegeschwindigkeit nach Gabe von Wasser oder von 0,9% NaCl-Lösung gleich groß.

Schon eine einmalige s.c. Injektion von 50 mg/kg Cortison bewirkt innerhalb von 2 Std eine geringere, aber signifikante Steigerung der Maximaldiurese nach Gabe von 0,9% NaCl auf 2,28 $\pm$ 0,33 ml/Ratte/Std (8 Versuchstiere).

Thyroxin hat in der angegebenen Dosis bei 5—10 tägiger Behandlung der hypophysenlosen Ratten weder einen Einfluß auf die Diurese noch auf die Salzausscheidung.

Die *Na^+-Ausscheidung* nimmt bei allen behandelten, intakten, mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewässerten Gruppen im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu. Da diese Steigerung in gleicher Weise wie bei Steroidbehandlung bei den mit 0,9% NaCl s. c. behandelten Kontrolltieren vorhanden ist, kann sie nichts mit der Wirkung der Steroide zu tun haben. Ihre Ursache bleibt zunächst unerklärlich.

Bei hypophysenlosen Tieren ist die Na^+-Ausscheidung nach Wässerung mit Wasser trotz der fehlenden Wasserdiurese *nicht* geringer als bei intakten Tieren. Dem entspricht eine wesentliche Steigerung der Na^+-Konzentration im Harn. — Nur bei oraler Gabe von 0,9% NaCl-Lösung zeigt sich eine Verminderung der Na^+-Ausscheidungsfähigkeit

nach Hypophysektomie (s. Tab. 1). DOCA und Cortison steigern die Na^+-Ausscheidungsfähigkeit der hypophysenlosen Ratten bis auf die bei normalen Tieren beobachteten Werte. Diese Steigerung läßt sich aber nur bei Wässerung mit 0,9% NaCl nachweisen, bei mit Wasser gewässerten Tieren bleibt die an sich normale Na^+-Ausscheidung nach der Steroidbehandlung weiterhin unverändert; dem entspricht im Hinblick auf die gesteigerte Diurese ein Absinken der Na^+-Konzentration im Harn unter der Behandlung.

Nach Wässerung mit Wasser ändert sich weder die *K^+-Konzentration* noch die *K^+-Ausscheidung* normaler Ratten unter Nebennierenrindensteroidbehandlung.

Nach Na^+-Belastung scheiden normale Ratten bei stark erhöhter K^+-Urin-Konzentration ein Mehrfaches der K^+-Menge aus, die sie unter Wasserbelastung verlieren, obgleich den Tieren kein K^+ zugeführt worden ist. Im akuten Versuch führt also die Zufuhr von Na^+ zum Verlust von K^+. Auf diesen Effekt haben die Steroide keinen Einfluß.

Die K^+-Ausscheidung hypophysenloser Ratten ist gegenüber Kontrolltieren ebenso stark oder stärker reduziert als die Na^+-Ausscheidung (Tab. 2). Die K^+-Konzentration im Harn ist bei hypophysenlosen Tieren nach oraler Gabe von Wasser ebenso hoch wie nach Wässerung mit 0,9%iger Kochsalzlösung. Die Behandlung mit DOCA oder Cortison bedingt — unabhängig von den Wässerungsflüssigkeiten — keine signifikante Steigerung der K^+-Ausscheidung im Harn: Die K^+-Ausscheidung folgt also hier in ihrem Verhalten *nicht* der Na^+-Ausscheidung. Da die Diurese durch die Steroide gesteigert wird, nimmt die K^+-Konzentration im Harn unter der Behandlung ab.

Die *Chlorid-Ausscheidung* mit Wasser gewässerter Tiere erfährt ebenso wie die Na^+-Ausscheidung am 5. Behandlungstag mit DOCA oder Cortison — und in gleichem Maße bei Behandlung mit täglichen s. c. Injektionen von 0,9% NaCl-Lösung (Kontrollen) eine Steigerung. Am 10. Behandlungstag unterscheidet sich dagegen die Cl'-Ausscheidung nicht mehr von den Ausgangswerten. Eine Erklärung ist auch hier nicht möglich.

Die Cl'-Ausscheidung hypophysenloser Tiere weicht von der Norm in gleicher Richtung und in gleichem Ausmaß wie die Na^+-Ausscheidung ab (Tab. 3). Wie die Na^+-Ausscheidung läßt sich auch die Cl'-Ausscheidung nach Gaben von 0,9%iger Kochsalzlösung durch DOCA oder Cortison steigern: Im Gegensatz zur Na^+-Ausscheidung wird jedoch die Cl'-Ausscheidung nicht ganz normalisiert. Bei den mit Wasser gewässerten hypophysenlosen Tieren ist die Cl'-Ausscheidung im Gegensatz zur Na^+-Ausscheidung verringert. Ein Wiederansteigen unter der Steroidbehandlung läßt sich nicht sicher nachweisen (Tab. 3).

Tabelle 1. *Natrium im Harn.* Natriumausscheidung und -konzentration im Harn normaler und hypophysektomierter Ratten nach 5 bzw. 10—12tägiger Behandlung mit 20 mg/kg DOCA (in Öl)/Tag s. c. oder 25 mg/kg Cortison (Kristallsuspension)/Tag s. c. Kontrollgruppen erhielten 0,5 ml 0,9% NaCl/Ratte je Tag s. c. Orale Wässerung mit Wasser oder isotonischer NaCl-Lösung (1,85 mÄq Na^+/Ratte).

P_1: Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung der Mittelwerte hypophysenloser und normaler gleichbehandelter Ratten.

P_2: Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung der Mittelwerte behandelter und unbehandelter Ratten bei gleicher oraler Belastung.

P_3: Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung der Mittelwerte gleichbehandelter Ratten unter Belastung mit Wasser und 0,9%iger NaCl-Lösung.

Die Anzahl der Tiere in den behandelten Gruppen beträgt jeweils 8, mit Ausnahme der cortisonbehandelten, hypophysektomierten Tiere nach 12tägiger Behandlung (hier $n = 6$), und der DOCA-substituierten hypophysenlosen bei allen Versuchen ($n = 6$). Bei abweichender Versuchszahl ist diese in Klammern angegeben. Wässerung mit Wasser bzw 0,9%iger NaCl-Lösung vgl. Methodik. Konzentrationen in Miliäquivalent-Prozent, Ausscheidungen in Milliäquivalent/Ratte/120 min. (Zahlen in Kursiv-Druck) Mittelwert $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Ratten		normale		hypophysektomierte	
Wässerung mit		Wasser	0,9% NaCl	Wasser	0,9% NaCl
Unbehandelte		0,67 $\pm$ 0,04 (64) *0,069 $\pm$ 0,006 (64)*	10,11 $\pm$ 0,53 (57) *0,626 $\pm$ 0,038 (57)*	— —	17,10 $\pm$ 2,46 (10) *0,347 $\pm$ 0,076 (10)*
Kontrollgruppen	5. Tag	0,82 $\pm$ 0,09 *0,135 $\pm$ 0,017*	15,45 $\pm$ 0,07 *0,070 $\pm$ 0,035*	6,41 $\pm$ 2,91 *0,070 $\pm$ 0,035*	— —
	P_1	— —	— —	< 0,01 *> 0,10*	— —
	P_2	— —	— —	— —	— —
	P_3	— —	< 0,001 *< 0,001*	— —	— —
	10.—12. Tag	0,73 $\pm$ 0,14 *0,098 $\pm$ 0,017*	16,29 $\pm$ 0,58 *1,232 $\pm$ 0,099*	2,50 $\pm$ 1,10 *0,008 $\pm$ 0,003*	15,73 $\pm$ 1,62 *0,547 $\pm$ 0,112*
	P_1	— —	— —	> 0,10 *< 0,05*	> 0,20 *< 0,001*
	P_2	— —	— —	— —	— —
	P_3	— —	< 0,001 *< 0,001*	— —	< 0,001 *< 0,001*

Tabelle 1. (Fortsetzung)

DOCA	5. Tag	2,32 ± 0,73	14,81 ± 0,36	1,95 ± 0,78	—
		0,358 ± 0,111	*1,211 ± 0,123*	*0,069 ± 0,029*	—
	P_1	—	—	> 0,10	—
		—	—	< *0,05*	—
	P_2	> 0,10	> 0,10	> 0,10	—
		> *0,05*	> *0,10*	> *0,10*	—
	P_3	—	< 0,001	—	—
		—	< *0,001*	—	—
	10.—12. Tag	1,11 ± 0,17	15,44 ± 0,43	1,20 ± 0,31	13,70 ± 0,67
		0,142 ± 0,020	*1,482 ± 0,098*	*0,081 ± 0,025*	*1,148 ± 0,087*
	P_1	—	—	> 0,10	> 0,10
		—	—	> *0,10*	< *0,05*
	P_2	> 0,05	> 0,10	> 0,10	> 0,10
		> *0,05*	> *0,05*	< *0,01*	< *0,01*
	P_3	—	< 0,001	—	< 0,001
		—	< *0,001*	—	< *0,001*
Cortison	5. Tag	1,62 ± 0,65	15,25 ± 0,40	0,95 ± 0,24	—
		0,213 ± 0,073	*1,283 ± 0,067*	*0,075 ± 0,017*	—
	P_1	—	—	> 0,10	—
		—	—	> *0,05*	—
	P_2	> 0,10	> 0,10	> 0,05	—
		> *0,05*	> *0,10*	> *0,10*	—
	P_3	—	< 0,001	—	—
		—	< *0,001*	—	—
	10.—12. Tag	1,28 ± 0,27	15,73 ± 0,34	0,69 ± 0,16	15,54 ± 0,25
		0,175 ± 0,035	*1,243 ± 0,113*	*0,063 ± 0,015*	*1,253 ± 0,109*
	P_1	—	—	> 0,05	> 0,10
		—	—	< *0,05*	> *0,10*
	P_2	> 0,05	> 0,10	< 0,05	> 0,10
		> *0,05*	> *0,10*	< *0,01*	< *0,001*
		—	< 0,001	—	< 0,001
	P_3	—	< *0,001*	—	< *0,001*

Tabelle 2. *Kalium im Harn*

Kaliumausscheidung und -konzentration im Harn normaler und hypophysektomierter Ratten. (Legende wie bei Tab. 1)

Ratten		normale		hypophysektomierte	
Wässerung mit		Wasser	0,9% NaCl	Wasser	0,9% NaCl
Unbehandelte		0,33 ± 0,03 (63) *0,040 ± 0,003 (63)*	2,04 ± 0,16 (57) *0,106 ± 0,008 (57)*	— —	1,74 ± 0,21 (10) *0,037 ± 0,010 (10)*
Kontroll-gruppen	5. Tag	0,20 ± 0,02 *0,032 ± 0,004*	1,62 ± 0,17 *0,131 ± 0,014*	2,34 ± 0,78 *0,015 ± 0,003*	— —
	P_1	— —	— —	< 0,01 *< 0,01*	— —
	P_2	— —	— —	— —	— —
	P_3	— —	< 0,001 *< 0,001*	— —	— —
	10.—12. Tag	0,21 ± 0,03 *0,028 ± 0,003*	1,39 ± 0,24 *0,098 ± 0,008*	3,96 ± 1,45 *0,015 ± 0,004*	1,20 ± 0,30 *0,037 ± 0,011*
	P_1	— —	— —	< 0,05 *< 0,05*	> 0,10 *< 0,001*
	P_2	— —	— —	— —	— —
	P_3	— —	< 0,01 *< 0,001*	— —	> 0,10 *> 0,05*
DOCA	5. Tag	0,22 ± 0,04 *0,036 ± 0,005*	1,25 ± 0,11 *0,101 ± 0,016*	0,50 ± 0,12 *0,020 ± 0,010*	— —
	P_1	— —	— —	> 0,10 *> 0,05*	— —
	P_2	> 0,10 *> 0,10*	> 0,10 *> 0,05*	< 0,05 *> 0,10*	— —
	P_3	— —	< 0,001 *< 0,001*	— —	— —

Tabelle 2. (Fortsetzung)

DOCA	10.—12. Tage	0,18 ± 0,03	1,15 ± 0,16	0,31 ± 0,19	0,51 ± 0,06
		0,023 ± 0,006	*0,110 ± 0,018*	*0,025 ± 0,008*	*0,044 ± 0,006*
	P_1	—	—	> 0,10	< 0,01
		—	—	*> 0,10*	*< 0,001*
	P_2	> 0,10	> 0,10	> 0,05	< 0,05
		> 0,10	*> 0,10*	*> 0,05*	*> 0,10*
	P_3	—	< 0,001	—	> 0,10
		—	*< 0,001*	—	*> 0,05*
Cortison	5. Tag	0,20 ± 0,03	1,37 ± 0,25	0,37 ± 0,04	—
		0,028 ± 0,004	*0,112 ± 0,019*	*0,032 ± 0,004*	—
	P_1	—	—	< 0,01	—
		—	—	*> 0,10*	—
	P_2	> 0,10	> 0,10	< 0,01	—
		> 0,10	*> 0.10*	*< 0,01*	—
	P_3	—	< 0,001	—	—
		—	*< 0,001*	—	—
	10.—12. Tag	0,18 ± 0,02	1,38 ± 0,15	0,76 ± 0,22	0,60 ± 0,13
		0,025 ± 0,003	*0,116 ± 0,018*	*0,070 ± 0,022*	*0,045 ± 0,006*
	P_1	—	—	< 0,05	< 0,01
		—	—	*> 0,05*	*< 0,001*
	P_2	> 0,10	> 0,10	< 0,05	< 0,05
		> 0,10	*> 0,10*	*< 0,05*	*> 0,10*
	P_3	—	< 0,001	—	> 0,10
		—	*< 0,001*	—	*> 0,05*

Tabelle 3. *Chloride im Harn*

Chloridausscheidung und -konzentration im Harn normaler und hypophysektomierter Ratten. (Legende wie bei Tab. 1)

Ratten		normale		hypophysektomierte	
Wässerung mit		Wasser	0,9% NaCl	Wasser	0,9% NaCl
Unbehandelte		0,98 ± 0,08 (66) *0,107 ± 0,010 (66)*	13,13 ± 0,54 (57) *0,755 ± 0,048 (57)*	— —	15,09 ± 0,85 (10) *0,307 ± 0,058 (10)*
Kontroll-gruppen	5. Tag	1,63 ± 0,13 *0,255 ± 0,023*	17,65 ± 0,57 *1,433 ± 0,078*	12,63 ± 2,05 *0,052 ± 0,017*	— —
	P_1	— —	— —	< 0,001 *< 0,001*	— —
	P_2	— —	— —	— —	— —
	P_3	— —	< 0,001 *< 0,001*	— —	— —
	10.—12.	0,68 ± 0,09 *0,091 ± 0,011*	18,05 ± 0,68 *1,354 ± 0,099*	3,45 ± 1,74 *0,026 ± 0,009*	7,26 ± 1,90 *0,378 ± 0,181*
	P_1	— —	— —	> 0,10 *< 0,001*	< 0,001 *< 0,001*
	P_2	— —	— —	— —	— —
	P_3	— —	< 0,001 *< 0,001*	— —	> 0,10 *< 0,05*
DOCA	5. Tag	2,36 ± 0,45 *0,382 ± 0,071*	17,51 ± 0,66 *1,436 ± 0,148*	2,13 ± 0,99 *0,067 ± 0,016*	— —
	P_1	— —	— —	> 0,10 *< 0,001*	— —
	P_2	> 0,10 *> 0,05*	> 0,10 *> 0,10*	< 0,01 *> 0,10*	— —
	P_3	— —	*< 0,001* < 0,001	— —	— —

Tabelle 3. (Fortsetzung)

DOCA	10.—12. Tag	1,20 ± 0,15 *0,161 ± 0,024*	15,26 ± 0,31 *1,463 ± 0,092*	1,18 ± 0,33 *0,077 ± 0,026*	11,53 ± 0,65 *0,979 ± 0,043*
	P_1	— —	— —	> 0,10 < *0,05*	< 0,001 > *0,10*
	P_2	< 0,01 < *0,05*	< 0,01 > *0,10*	> 0,10 > *0,05*	> 0,05 < *0,01*
	P_3	— —	< 0,001 < *0,001*	— —	< 0,001 < *0,001*
Cortison	5. Tag	1,41 ± 0,19 *0,198 ± 0,019*	17,44 ± 0,52 *1,470 ± 0,086*	1,07 ± 0,47 *0,086 ± 0,018*	— —
	P_1	— —	— —	> 0,10 < *0,001*	— —
	P_2	> 0,10 > *0,05*	> 0,10 > *0,10*	< 0,001 > *0,05*	— —
	P_3	— —	< 0,001 < *0,001*	— —	— —
	10.—12. Tag	0,97 ± 0,13 *0,136 ± 0,022*	17,09 ± 0,57 *1,342 ± 0,103*	0,52 ± 0,12 *0,047 ± 0,012*	12,79 ± 0,14 *1,047 ± 0,105*
	P_1	— —	— —	< 0,05 < *0,01*	< 0,01 > *0,05*
	P_2	> 0,05 > *0,05*	> 0,05 > *0,10*	> 0,05 > *0,05*	< 0,01 < *0,01*
	P_3	— —	< 0,001 < *0,001*	— —	< 0,001 < *0,001*

Während des gesamten Versuchs nahmen die intakten männlichen Tiere 15,5 ± 2,9 g ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) zu, während die gleichbehandelten intakten Weibchen nicht zunahmen (auf —0,5 ± 2,8 g). Die mit DOCA behandelten intakten Männchen nahmen nicht stärker zu als die Kontrolltiere (14,0 ± 2,5 g). Bei den Weibchen führte die Behandlung mit DOCA zu einer signifikanten Gewichtszunahme (9,0 ± 2,8 g). Die Behandlung mit Cortison führte in jedem Fall zu starken Gewichtsverlusten (Männchen —39,5 ± 3,9 g, Weibchen —28,3 ± 3,7 g).

Das an sich in beiden Geschlechtern ohne Unterschied wesentlich reduzierte Gewicht der hypophysenlosen Ratten (132,5 ± 5,1 g, 26 Tiere) fiel nach 12tägiger Cortisonbehandlung um 29,4 ± 2,0 g (8 Tiere) ab, blieb dagegen bei den mit DOCA oder Thyroxin behandelten Tieren ebenso wie bei den Kontrollen unverändert.

Diskussion

Die wasserausscheidungsfördernde Wirkung von Cortison (und auch von DOCA) in den hier gegebenen relativ hohen Dosen bei normalen Ratten steht im Einklang mit diuretischen Wirkungen *beider* Gruppen von Nebennierenrindensteroiden, die von W. R. Boss, C. M. Osborn u. A. Renzi (1952): (Submaximale Wasserdiurese bei Ratten — DOCA und Cortison), J. O. Davis u. D. S. Howell (1953: Submaximale Wasserdiurese beim Hund — DOCA und Cortison), O. V. Serek u. C. H. Best (1952) sowie W. W. Swingle u. a. (1953) (Spontandiurese bei Hunden — Cortison) und schließlich L. Hédon u. Mitarb. (1953: Spontandiurese beim Hund — Cortison) beschrieben wurden. Besonders hervorgehoben werden muß aber die Steigerung der — im Gegensatz zu den aufgeführten Diureseformen und zur Diurese unserer mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewässerten Ratten — durch diuretisch wirksame Pharmaka kaum beeinflußbaren *maximalen* Wasserdiurese.

Eine Na^+-(und Cl'-)retinierende Wirkung, die man unter der Wirkung von DOCA — aber auch von Cortison — erwarten sollte, läßt sich unter unseren akuten Versuchsbedingungen *nicht* nachweisen.

Die nahezu vollständige Aufhebung der Wasserdiurese bei unseren hypophysektomierten Ratten (Abb. 1) ist schon früher bei hypophysektomierten Ratten (W. R. Boss, C. M. Osborn, A. A. Renzi 1952; G. Chen, E. M. K. Geiling 1943) und Hunden (D. P. Earle, S. J. Farber, R. C. DeBodo, M. Kurtz, M. W. Sinkoff 1953) sowie Menschen mit den klinischen Zeichen einer Hypofunktion des Hypophysenvorderlappens (A. A. G. Lewis 1953; V. Wynn, O. Garrod 1955) beschrieben worden. Sie gleicht der Hemmung der Wasserausscheidung nach Adrenalektomie bei Ratten (C. H. Beatty u. a. 1954, W. R. Boss, J. H. Birnie, R. Gaunt 1950, W. R. Bristol, V. A. Drill 1952, C. Cavallero, E. Dova, L. Rossi 1954, W. D. Lotspeich 1949, I. C. Jones 1955, D. Dexter, H. B. Stoner 1953, D. F. Cole 1954) und Hunden (K. E. Roberts, R. F. Pitts 1952, J. C. Roemmelt, O. W. Sartorius, R. F. Pitts 1954; W. W. Swingle u. a. 1953b) und bei der Nebenniereninsuffizienz des Menschen (Literatur bei A. A. G. Lewis 1953 und

H. W. Smith 1951). Auch die geringere Beeinträchtigung der Wasserausscheidung nach Wässerung mit isotonischer NaCl-Lösung, die wir bei hypophysenlosen Ratten gefunden haben, entspricht dem von W. R. Bristol u. A. V. Drill (1952) beschriebenen Verhalten nebennierenloser Ratten.

Hervorgehoben werden muß aber, daß auch nach Gabe von 0,9%iger NaCl-Lösung die Wasserausscheidung gegenüber normalen intakten Ratten wesentlich — und in etwas stärkerem Maß als bei den adrenalektomierten Ratten von W. R. Bristol u. A. V. Drill (1952) — verringert war. Die Wasserausscheidungsstörung kann daher nicht einfach als Folge der Na^+-Verluste des Organismus nach Adrenalektomie oder auf Grund der Nebennierenrindeninsuffizienz nach Hypophysektomie erklärt werden.

Die Wasserausscheidungsstörung bei Ausfall der Nebennierenrinden wird häufig mit der unter diesen Bedingungen regelmäßig nachweisbaren (I. A. Mirsky, G. Paulisch, M. Stein u. R. Jinks 1954; C. Cavallero u. a. 1954) Vermehrung von antidiuretisch wirksamem Material (Vasopressin) im Blut in Zusammenhang gebracht. Das Auftreten einer gleichartigen Wasserausscheidungsstörung nach Hypophysektome spricht gegen diese Deutung.

In jüngster Zeit wurde nachgewiesen, daß sich bei der Ratte nach Hypophysektomie der Hypophysenstiel in ein morphologisch hypophysenhinterlappenähnliches Gebilde umorganisiert (D. C. Billenstien, T. F. Leveque 1955), das auch Vasopressin in die Blutbahn abgibt (C. W. Lloyd u. a. 1954, 1955). Die Vasopressin-Sekretion dieses Ersatz-Hypophysenhinterlappens kann aber nicht als Ursache der Diuresehemmung der hypophysektomierten Ratten angesehen werden; denn nach Hypophysektomie ist auch die Wasserausscheidung nach Wässerung mit 0,9%iger NaCl-Lösung wesentlich verlangsamt. Wir konnten aber kürzlich zeigen (H. Brunner, G. Kuschinsky, G. Peters 1956a), daß Vasopressin unter diesen Bedingungen keine oder nur eine ganz geringfügige antidiuretische Wirkung ausübt.

Die partiell normalisierende Wirkung des Glucocorticoids Cortison und des Mineralocorticoids DOCA auf die Wasserausscheidung hypophysenloser Ratten war in unseren Versuchen völlig gleichartig: Das zeitlich spätere Einsetzen der DOCA-Wirkung kann ebenso gut durch die verschiedenen pharmazeutischen Zubereitungen der verwandten Präparate (ölige Lösung von DOCA, Kristallsuspension von Cortisonacetat in Wasser) wie durch Unterschiede in der Wirkung beider Hormone erklärt werden. Vielleicht wird auch die Wirkungslosigkeit von DOCA — im Gegensatz zu Cortison — bei den Wasserausscheidungsstörungen der menschlichen und tierischen Nebennierenrindeninsuffizienz (Editorial, Lancet 1954) nur durch den verspäteten Wirkungseintritt von DOCA vorgetäuscht. — Die Verbesserung der Wasserausscheidung durch DOCA und Cortison in unseren Versuchen steht übrigens in Übereinstimmung mit ähnlichen Ergebnissen von W. R. Boss, C. M. Osborn u. A. A. Renzi (1952) mit DOCA und einem wäßrigen Nebennierenextrakt.

Die Steigerung der Diurese hypophysektomierter Ratten durch DOCA und Cortison muß aus folgenden Gründen als Substitutionswirkung angesehen werden, trotzdem die Hormone bei intakten Ratten einen gleichsinnigen pharmakodynamischen Effekt haben: 1. Die Beschleunigung der Diurese durch DOCA und Cortison ist bei hypophysektomierten Ratten — vor allem nach Wässerung mit 0,9%iger NaCl-Lösung — viel stärker als bei intakten Ratten. 2. Bei hypophysektomierten Ratten nimmt die Beschleunigung der Diurese unter DOCA-Behandlung vom 5. bis zum 12. Tag zu, bei intakten Kontrollen dagegen ab.

Wir haben kürzlich dargelegt (H. Brunner, G. Kuschinsky u. G. Peters 1956a), daß bei normalen Ratten nach Gabe von isotonischer oder hypotonischer NaCl-Lösung innerhalb der folgenden 2 Std Wasser und Salz etwa gleich schnell ausgeschieden werden. Bei hypophysenlosen Ratten ist dagegen die Fähigkeit, eine gegebene NaCl-Menge (Wässerung mit 0,9% NaCl) auszuscheiden, nur auf etwa die Hälfte der Norm, die Wasserausscheidung dagegen auf ungefähr $^1/_4$ herabsetzt, so daß die Na^+-Ausscheidung jetzt etwas schneller als die Wasserausscheidung erfolgt (Anstieg der Na^+-Kozentration im Harn); die Cl'-Ausscheidung scheint im gleichen Sinn wie die Na^+-Ausscheidung verschoben zu sein. Cortison und DOCA normalisieren die Salz- und Wasserausscheidung bei Wässerung mit 0,9%iger NaCl-Lösung und damit das Salz/Wasser-Verhältnis. Bei dem Versuch zur Auslösung einer Wasserdiurese (Wässerung mit Wasser) scheiden hypophysenlose Ratten ebenso viel Na^+- und Cl' aus wie intakte Tiere: Die Behandlung mit DOCA und Cortison steigert diese zu Salzverlusten führende Salzausscheidung bei Wassergabe bei unseren hypophysektomierten Ratten nicht. Dieser Befund steht im Widerspruch zu der von D. F. Cole (1954) nach Versuchen an adrenalektomierten Ratten getroffenen Feststellung, daß diese Tiere — im Gegensatz zu normalen — nach Sustitutionsbehandlung mit DOCA und Cortison Wasser nurmehr unter gleichzeitigen Salzverlusten auszuscheiden vermögen. Die Divergenz dürfte eher auf Differenz in der Methodik (5-Std-Harnsammelperioden bei D. F. Cole) als auf Unterschiede zwischen Nebennieren- und hypophysenlosen Ratten zurückzuführen sein.

Bei normalen Ratten ist die Größe der K^+-Ausscheidung im Harn direkt von der Größe der Na^+-Ausscheidung abhängig: Steigerung der Na^+-Ausscheidung durch orale Zufuhr von Salz (H. Brunner, G. Kuschinsky u. G. Peters 1956a; I. C. Jones 1955) oder durch Vasopressin (H. Brunner, G. Kuschinsky u. G. Peters 1956a) führt zu einer Steigerung der K^+-Ausscheidung. Nach der Hypophysektomie ist zwar die K^+-Ausscheidung nach oraler Gabe von Wasser nicht immer signifikant gesenkt, es fehlt aber immer die signifikante Steigerung durch orale Gabe von 0,9% NaCl anstatt Wasser, die beim intakten

Tier beobachtet wird. Die K^+-Ausscheidungsförderung durch gesteigerte Na^+-Ausscheidung — die man zur Zeit noch ebenso gut durch den Berlinerschen Austauschmechanismus (R. W. Berliner, T. J. Kennedy jr. u. J. Orloff 1954) wie durch Konkurrenz von Na^+ und K^+ am tubulären Rückresorptionsmechanismus erklären kann — ließ sich unter unseren Versuchsbedingungen durch die Behandlung mit DOCA oder mit Cortison *nicht* widerherstellen.

Im Gegensatz dazu fanden D. Seldin (1954) bei normalen Ratten *sofort* nach großen DOCA-Dosen einen Anstieg der Ausscheidung von Kalium (sowie Säure und Ammoniumionen) im Harn und D. S. Howell u. J. O. Davis (1954) eine vorübergehende Steigerung der K^+-Ausscheidung normaler Hunde durch DOCA, Cortison und ACTH (J. O. Davis, D. S. Howell 1953).

Summary

1. Hypophysectomy causes a sharp drop in the maximum rate of diuresis after oral hydration with water in rats. Daily subcutaneous injections of 25 mg./kg. cortisone acetate or of 20 mg./kg. DOCA for a period of twelve days produce a similar increase of the maximum rate of diuresis though normal values are not attained. After a shorter period of treatment (5 days) cortisone does, but DOCA does not yet attain its full effect. — In normal intact rats cortisone and DOCA in the same doses administered for the same periods cause smaller but definite increases of the maximum rate of water diuresis.

2. The maximum rate of diuresis after oral hydration with 0.9 per cent saline is considerably diminished in hypophysectomized rats. Treatment with cortisone or DOCA results in full normalisation. — In intact rats DOCA or cortisone cause a small increase in the maximum rate of diuresis after hydration with saline.

3. Daily subcutaneous injections of 0.5 mg. thyroxin per rat do not influence the diuresis of hypophysectomized rats.

4. The ability of hypophysectomized rats to excrete a load of NaCl administered orally as 0.9 per cent saline is normalised by cortisone as well as by DOCA in the dosage stated above. On the other hand DOCA or cortisone do not increase the salt loss during water diuresis.

5. While in intact rats any increase in urinary excretion of sodium causes an increase in urinary excretion of potassium, this relationship is not valid in hypophysectomized rats either untreated or treated with cortisone or DOCA.

6. A comparison of the results of the present study with results of other investigators leads to the following conclusions:

a) There is no difference between the inhibition of diuresis caused by hypophysectomy and by adrenalectomy.

b) It does not appear possible to attribute the inhibition of diuresis in adrenalectomized and hypophysectomized animals to an increased secretion or to a delayed destruction of pituitary antidiuretic material (vasopressin).

c) The loss of neurohypophyseal secretion does not appear to influence the renal functions of hypophysectomized rats.

Literatur

Beatty, C. H., R. M. Boeck and R. D. Peterson: Water tolerance test for functioning adrenal cortical tissue in the rat. Amer. J. Physiol. **177**, 287 (1954). — Berliner, R. W., T. J. Kennedy jr, and J. Orloff: Factors affecting the transport of potassium and hydrogen ions by the renal tubules. Arch. internat. Pharmacodynamie **97**, 299 (1954). — Billenstien, D. C., and T. F. Leveque: The reorganization of the neurohypophyseal stalk following hypophysectomy in the rat. Endocrinology (Springfield, Ill.) **56**, 704 (1955). — Boss, W. R., C. M. Osborn and A. A. Renzi: Effects of adrenal cortical extract on renal function in hypophysectomized rats. Endocrinology, (Springfield, Ill.) **51**, 66 (1952). — Bristol, W. R., and V. A. Drill: Saline hydration and diuresis after adrenalectomy. Endocrinology, (Springfield, Ill.) **50**, 677 (1952). — Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die Wirkung von Vasopressin auf die renale Wasser- und Salzausscheidung der Ratte bei Veränderungen der Salzkonzentration des Trinkwassers und nach Nierenparenchymresektionen. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 434 (1956a). — Brunner, H., G. Kuschinsky u. G. Peters: Die maximale Geschwindigkeit der renalen Wasserausscheidung bei der Ratte und ihre Begrenzung. In Vorbereitung (1956b). — Cavallero, C., E. Dova and L. Rossi: Antidiuretic activity in the neurohypophysis of rats after adrenalectomy and replacement therapy. J. of Endocrin. **10**, 228 (1954). — Chen, G., and E. M. K. Geiling: Antidiuretic effect of posterior pituitary extracts in completely and partially hypophysectomized rats. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **52**, 152 (1943). — Cole, D. F.: Effects of deoxycorticosterone acetate and cortisone on the excretion of hypotonic saline by adrenalectomized rats. J. of Endocrin. **11**, 261 (1954). — Davis, J. O., and D. S. Howell: Comparative effect of ACTH, cortisone and DCA on renal function, electrolyte excretion and water exchange in normal dogs. Endocrinology (Springfield, Ill.) **52**, 254 (1953). — Davis, J. O., D. S. Howell, G. L. Laqueur and E. C. Peirce II: Renal hemodynamic function, electrolyte metabolism and water exchange in adrenalectomized-hypophysectomized dogs. Amer. J. Physiol. **176**, 411 (1954). — de Bodo, R. C., and M. W. Sinkoff: The role of growth hormone in carbohydrate metabolism. Ann. New York Acad. Sci. **57**, 23 (1953). — Dexter, D., and H. B. Stoner: The role of the adrenal medulla in water diuresis in rats. J. of. Physiol. **118**, 486 (1953). — Earle, D. P., S. J. Farber, R. C. de Bodo, M. Kurtz and M. W. Sinkoff: Effects of ACTH, cortisone and hydrocortisone on renal functions in hypophysectomized dogs. Amer. J. Physiol. **173**, 189 (1953). — Editorial: Renin. Lancet, **266**, 1278 (1954). — Hédon, L., L. L. van Kien, J. Macabien et J. Turchini: Effets de la corticostimuline et de la cortisone sur le métabolisme du chien normal. J. de Physiol. **45**, 127 (1953). — Howell, D. S., and J. O. Davis: Relationship of sodium retention to potassium excretion by the kidney during administration of desoxycorticosterone acetate to dogs. Amer. J. Physiol. **179**, 359 (1954). — Ingle, D. J.: In E. J. Farris and J. H. Griffith Ed.: The Rat in Labaratory Investigation, S. 435, Philadelphia: J. B. Lippincott Co., 1949. — Jones, I. C.: The effects of adrenalectomy on the rat with diabetes insipidus. J. of Endocrin. **10**, XI (1955), — Kuschinsky, G., u. H. Langecker: Eine mercurimetrische Bestimmung des

Chlorids im Harn. Biochem. Z., **318**, 164 (1947). — Lewis, A. A. G. : The control of the renal excretion of water. Ann. Roy. Coll. Surg. **13**, 23 (1953). — Lloyd, C. W., and S. Pierog: Studies on the antidiuretic activity of blood and hypothalamus of hypophysectomized rats. Endocrinology (Springfield, Ill.) **56**, 718 (1955). — Lloyd, C. W., E. Loewy, S. Pierog, K. Bradwick and R. Sostheim: Presence of antidiuretic material in blood of hypophysectomized rats. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **85**, 33 (1954). — Lotspeich, W. D.: The effects of adrenalectomy on the renal tubular reabsorption of water in the rat. Endocrinology (Springfield, Ill.), **44**, 314 (1949). — Mirsky, I. A., G. Paulisch, M. Stein and R. Jinks: The antidiuretic activity of the plasma of adrenalectomized, hypophysectomized and adrenalectomized-hypophysectomized rats. Endocrinology (Springfield, Ill.), **54**, 691 (1954). — Roberts, K. E., and R. F. Pitts: The influence of cortisone on renal function and electrolyte excretion in the adrenalectomized dog. Endocrinology (Springfield, Ill.), **50**, 51 (1952). — Roemmelt, J. C., O. W. Sartorius and R. F. Pitts: Excretion and reabsorption of sodium and water in the adrenalectomized dog. Amer. J. Physiol. **169**, 124 (1954). — Seldin, D.: zitiert nach R. W. Berliner, T. J. Kennedy jr. u. J. Orloff, 1954. — Serek, O. V., and C. H. Best: Intramuscular cortisone administration to dogs. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **80**, 594 (1952). — Smith, H. W.: The Kidney. Structure and Function in Health and Disease. New York: Oxford University Press, (1951). — Snedecor, G. W.: Statistical Methods Applied to Experiments in Agriculture and Biology. Ames, Iowa: The Iowa State College Press (1950). — Swingle, W. W., E. J. Fedor, M. Ben, R. Maxwell, C. Barker and G. Barlow: Induction of diabetes insipidus in adrenalectomized dogs with cortisone. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **82**, 571 (1953a). — Swingle, W. W., G. Barlow, E. J. Fedor, M. Ben, P. Maxwell, E. Collins and C. Barker: Effect of increasing cortisone dosage on serum electrolytes, plasma volume and arterial pressure of adrenalectomized dogs. Amer. J. Physiol. **173**, 4 (1953b).

Prof. Dr. G. Kuschinsky, Mainz, Pharmakol. Institut d. Universität

Arch. exper. Path. u. Pharmakol., Bd. 228, S. 596—614 (1956)

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
(Vorstand: Prof. Dr. F. Eichholtz)

Der Austausch von radioaktivem Phosphat mit dem α-, β- und γ-Phosphor von ATP und mit Kreatinphosphat bei der Kontraktur des Froschrectus durch Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin

Von

A. Fleckenstein, J. Janke und R. E. Davies
(Unter Mitarbeit von W. Hartz und H. Richter)

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Februar 1956)

Vorausgegangene Untersuchungen haben gezeigt, daß die — durch depolarisierende Kontrakturstoffe („Muskel-Katelektrotonica") erzeugten — reversiblen Dauerverkürzungen des Froschrectus ohne wesentliche Veränderung der ATP- und ADP-Werte eintreten, während andere Phosphorsäureverbindungen, insbesondere Kreatinphosphat, eine deutliche Abnahme erkennen lassen [Fleckenstein, Janke, Kruse u. Lechner (1955)]. Die Längen- bzw. Spannungsänderungen des M. rectus sind demnach keine Funktion des intracellulären ATP- bzw. ADP-Gehaltes. Es ist jedoch nicht von der Hand zu weisen, daß — trotz der Konstanz der ATP- und ADP-Werte — eine gesteigerte Spaltung und Resynthese von ATP mit dem Zustand einer pharmakologischen Dauerkontraktur vergesellschaftet ist. Bei vielen biochemischen Umsetzungen ist es heute möglich, mittels radioaktiver Isotope Einblicke in die Reaktionsgeschwindigkeiten zu gewinnen. Es liegt daher die Frage nahe, ob nicht eine etwaige Steigerung des intermediären Phosphat-Stoffwechsels während pharmakologischer Kontrakturen an einem verstärkten Einbau von radioaktivem ^{32}P in die ATP- und Kreatinphosphat-Fraktion erkannt werden kann. Studien dieser Art lassen sich neuerdings ohne größere Schwierigkeit auf papierchromatographischer Basis durchführen [vgl. Fleckenstein, Janke u. Davies (1955)]. Insbesondere ist es auf diesem Wege möglich, die Austauschgeschwindigkeiten des α-, β- und γ-Phosphors von ATP getrennt zu bestimmen und so die besonders interessierenden Umsetzungen des terminalen γ-Phosphors von ATP — unverdeckt durch die Reaktionen des α- und β-Phosphors — sichtbar zu machen. Die folgenden Untersuchungen sollten klären:

a) ob bei Kontrakturen des Froschrectus infolge Einwirkung von Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin ein verstärkter Einbau von ^{32}P-markiertem Orthophosphat in die energiereichen Phosphorsäure-Verbindungen nachweisbar ist,

b) ob kontrakturverhütende Substanzen (Lokalanaesthetica, Curare) einen den Kontrakturstoffen entgegengesetzten Effekt auf die Aufnahme von ^{32}P-markiertem Orthophosphat besitzen.

Methodik

1. Versuchsanordnung

Die vorliegenden Studien wurden an paarigen, isolierten M. recti (Gewicht etwa 200 mg) von Eskulenten durchgeführt. Zur Befestigung der Muskeln verblieb am oberen Ende jeweils ein kleines Stück Sternum, an das untere, sehnige Ende wurde eine Fadenschlinge gelegt. Nach der Wägung wurden die Muskeln für 15 min bei einer Belastung von 8,5 g in sauerstoffdurchperlte Frosch-Ringer-Lösung gegeben. Anschließend wurde dann der eine M. rectus für 30 min als Kontrolle einer radioaktiven Phosphat-Ringer-Lösung von 20° C ausgesetzt, welche in 30 ml meist etwa 1 mC $^{32}PO_4$ (in anderen Versuchen etwa 4 mC) enthielt. Die Phosphat-Ringer-Lösungen wurden jeweils durch Zusammenmischen einer froschisotonischen Natriumphosphat-Pufferlösung von p_H 7,1 mit einer gewöhnlichen Frosch-Ringer-Lösung hergestellt. Der Phosphatgehalt dieser Lösungen wurde in 3 verschiedenen Versuchsreihen auf 0,4 μmol bzw. 8 μmol bzw. 16 μmol/ml eingestellt. Der andere M. rectus wurde ebenfalls für 30 min in die gleiche radioaktive Phosphat-Ringer-Lösung wie der Kontrollmuskel eingetaucht, jedoch unter Zugabe eines Kontrakturstoffs (Acetylcholin 1:10000, Nicotintartrat 1:2500, Succinylbischolin 1:5000). In den Experimenten, die dem Studium kontrakturverhütender Substanzen dienten, wurde in analoger Weise vorgegangen. Hier wurde der eine M. rectus für 30 min in der radioaktiven, kontrakturstoffhaltigen Phosphat-Ringer-Lösung zur Verkürzung gebracht, während der andere M. rectus in einer sonst identischen Lösung — infolge Beimischung eines kontrakturverhütenden Antagonisten — im erschlafften Zustand verblieb. Temperatur, Belastung und Sauerstoffdurchperlung waren in allen Versuchen konstant. Die Verkürzung wurde auf einem Kymographion registriert. Am Ende der Einwirkungszeit wurden die Muskeln — nach 3 min Spülung mit reiner Ringer-Lösung — durch rasches Anheben eines Dewar-Gefäßes in flüssigen Stickstoff versenkt; 2 min später wurden sie dann in hartgefrorenem Zustand durch Scherenschlag von ihrer unteren Befestigung sowie vom Sternumrest abgetrennt und in einem mit flüssiger Luft gekühlten Mörser pulverisiert. Fadenrest und Sternum wurden anschließend zurückgewogen. Zur Extraktion des Muskelpulvers (3 min Dauer) dienten 2,5 ml 5%ige Trichloressigsäure von 0° C.

2. Papierchromatographische Arbeitsweise

Die papierchromatographische Aufarbeitung der Extrakte erfolgte im Prinzip nach dem von Fleckenstein u. Janke (1953) — auf der Basis der Methode von Eggleston u. Hems (1952) — ausgearbeiteten Verfahren [ausführliche Beschreibung vgl. Fleckenstein (1955)]. Für die Trennung radioaktiver Phosphorsäure-Verbindungen erwiesen sich folgende Modifikationen als zweckmäßig:

a) Spezielle Technik bei der Anwendung des I. Lösungsmittels. Das I. Lösungsmittel (90 Teile Isopropyläther + 60 Teile 98%ige Ameisensäure in „aufsteigender" Anordnung) bewegt die eine Hauptfraktion (anorg. P + Kreatin-P) von der

Startlinie weg, während die andere Hauptfraktion des „organischen Gesamt-P" (enthaltend ATP, ADP, phosphorylierte Zucker, „Dritte Fraktion" usw., jedoch kein Kreatinphosphat) an der Startlinie zurückbleibt. Nach einmaliger Anwendung des I. Lösungsmittels sind jedoch meist noch Spuren von anorganischem ^{32}P im Bereich der Startlinie festzustellen. Eine vollständige Reinigung des „organischen Gesamt-P" von anhaftendem anorganischem ^{32}P ließ sich durch folgendes Verfahren erreichen:

Anwendung des I. Lösungsmittels in üblicher Anordnung für die Dauer von 1 Std. Anschließend ½ Std Trocknung der Chromatogramme bei Zimmertemperatur. Auftropfen von 5 μl einer Phosphatlösung ($Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$ Konz. 1:200 in Aqua dest. = 2 μg P) auf die — an der Startlinie sitzenden Verbindungen des „organischen Gesamt-P". Erneute Anwendung des I. Lösungsmittels für weitere 3 Std; dadurch wird das zugetropfte anorganische Phosphat mitsamt den letzten Spuren von anorganischem ^{32}P von der Startlinie weggeführt.

b) Anwendung des II. Lösungsmittels. Das II. Lösungsmittel wurde in allen Versuchen in „absteigender" Anordnung benutzt. Vorher wurde, wie üblich, derjenige Teil der Chromatogramme abgeschnitten, der die Hauptfraktion (anorg. P + Kreatin-P) enthält. Als II. Lösungsmittel diente — einem Vorschlag von Gerlach, Weber u. Döring (1955) entsprechend — folgendes Gemisch (Anwendungszeit 36 Std bei 26° C):

5 ml Äthanol + 18 mg 8-Oxychinolin
30 ml n-Propanol
25 ml n-Butanol
30 ml (25%ig) Ammoniak
10 ml H_2O.

Nach 36 Std wurden die Chromatogramme ½ Std lang bei Zimmertemperatur getrocknet und dann nochmals für weitere 24 Std „absteigend" mit einem etwas modifizierten II. Lösungsmittel folgender Zusammensetzung behandelt:

35 ml Propanol
25 ml Butanol
30 ml (25%ig) Ammoniak
10 ml H_2O.

Bei dieser Technik wird das Auftreten UV-absorbierender Fronten in den Chromatogrammen verhütet und eine optimale Trennung von ATP und ADP erreicht. In den meisten Versuchen wurde anschließend noch ein III. Lösungsmittel (15 ml 30%ige Trichloressigsäure, 25 ml 80%ige Ameisensäure, 40 ml n-Butanol, 20 ml n-Propanol, 25 ml Aceton, vgl. Gerlach u. a.) bei Zimmertemperatur senkrecht zur bisherigen Laufrichtung, d. h. zweidimensional „aufsteigend" angewendet (Laufzeit 18 Std). Man erreicht dadurch eine völlige Reinigung der Nucleosid-Diphosphate und Nucleosid-Triphosphate, d. h. ADP und ATP von den letzten etwa noch vorhandenen Spuren von Nucleosid-Monophosphaten, phosphorylierten Triosen und Hexosen.

3. Bestimmung der Aufnahme von ^{32}P in die einzelnen Fraktionen

Nach Lokalisation von ATP und ADP im Photoprint-Verfahren nach Markham u. Smith wurden die P-haltigen Areale in den Chromatogrammen mittels Molybdatreagens + nachfolgender UV-Bestrahlung in üblicher Weise entwickelt, ausgeschnitten und feucht verascht. Anschließend wurde der P-Gehalt der Areale nach Berenblum u. Chain elektrophotometrisch bestimmt. Bei dieser P-Bestimmungsmethode fallen 5 ml Phosphormolybdat-Lösung an, deren Radioaktivität nach Verdünnung mit Aceton in einem Flüssigkeitszählrohr (Type FHZ 41 der Firma Frieseke u. Höpfner, Erlangen-Bruck) gemessen wurde. Das Fassungsvermögen des Zählrohrs betrug 15 ml; es wurde daher jeweils 4 ml Phosphormolybdat-Lösung mit 11 ml Aceton versetzt und gut durchgemischt. Zur chemischen Bestimmung des

extracellulären P wurde 0,1 ml (bei phosphatreichen Lösungen 0,01 ml) der radioaktiven Phosphat-Ringer-Lösung verwendet. Da die Aktivität dieser Lösung sehr hoch ist, wurde die anschließende Zählung mit einer Mischung von 0,1 ml Phosphormolybdat-Lösung + 14,9 ml Aceton durchgeführt. Zur Spülung der Zählrohre und sämtlicher anderer Glasgeräte, die mit den radioaktiven Lösungen in Berührung kamen, wurde 3 n-H_2SO_4 (technisch) verwendet. Nach den unter Umständen sehr ausgedehnten Waschprozeduren wurde jedes Glasgerät auf etwa noch anhaftende Radioaktivität geprüft. Glasbecher und Reagensgläschen, welche hochaktive, extracelluläre Phosphat-Ringer-Lösung enthielten, konnten unter Umständen wochenlang nicht mehr verwendet werden. Nach Korrektur der Zählwerte unter Berücksichtigung des Nulleffektes der Röhre, der Totzeit des Zählers und der Zerfallszeit von ^{32}P wurden die spezifischen Aktivitäten der verschiedenen P-Fraktionen für die Zeit Null berechnet. Die spez. Aktivitäten wurden dabei jeweils absolut in cts/min/μgP ausgedrückt sowie relativ in Prozent der spez. Aktivität des extracellulären anorganischen Phosphats angegeben.

Ausgehend von etwa 2 ml Muskelextrakt wurden folgende P-Fraktionen in Doppelbestimmungen analysiert:

a) Kreatinphosphat nach der Methode von Eggleton u. Eggleton. Hierzu wurde jeweils 1 ml Trichloressigsäure-Extrakt sofort nach dem Abzentrifugieren der Muskelbestandteile abgezweigt und in einem Zentrifugengläschen mit Bariumhydroxyd bei 0° C gegen Phenolphthalein neutralisiert. Nach 15 min Stehen bei 0° C wurde zweimal zentrifugiert und die überstehende — das Kreatinphosphat enthaltende — Lösung jeweils in frische Zentrifugengläschen gegeben. Anschließend wurde 2 × 0,1 ml dieser Lösung zur quantitativen Kreatinphosphat-Bestimmung verwendet. Die restlichen 0,6—0,7 ml wurden jeweils mit 0,08 ml Phosphatlösung ($Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O + H_2O$ im Verhältnis 1:200) versetzt und dann mit Bariumhydroxyd erneut präcipitiert. Dabei werden Spuren von anorganischen ^{32}P, die bei der ersten Fällung mit Bariumhydroxyd nicht entfernt wurden, ausgefällt, ohne daß sich die Kreatinphosphat-Werte wesentlich verändern. Nach 15 min Stehen bei 0° C wurde wiederum zweimal abzentrifugiert und die überstehende Lösung in frische Zentrifugengläschen übergeführt. Je 2 × 0,2 ml dieser Lösung wurden anschließend zur Bestimmung der spezifischen Aktivitäten des Kreatinphosphors verwendet.

b) Die Hauptfraktion (anorg. P + Kreatin-P).

c) Die Hauptfraktion des „organischen Gesamt-P" (ohne Kreatin-P). Die beiden Hauptfraktionen (b) und (c) wurden nach papierchromatographischer Trennung durch das I. Lösungsmittel auf P-Gehalt und Radioaktivität analysiert.

d) α-, β- und γ-Phosphor von ATP. Hierbei wurde unter Berücksichtigung der oben erwähnten Modifikationen zuerst der ATP-Gehalt in 100 μl Trichloressigsäureextrakt nach papierchromatographischer Aufarbeitung bestimmt und anschließend die mittlere spezifische Aktivität der 3 P-Atome von ATP ($P^\alpha + P^\beta + P^\gamma/3$) ermittelt. In einer zweiten Probe des Trichloressigsäure-Extraktes wurde ATP auf nichtenzymatischem Wege durch 48 Std Aufbewahrung bei Zimmertemperatur großenteils in ADP übergeführt. Hieraus ergab sich — nach papierchromatographischer Aufarbeitung von 100 μl — die mittlere spezifische Aktivität der beiden P-Atome von ADP ($P^\alpha + P^\beta/2$). Dabei wird nicht unterschieden zwischen dem ursprünglich in den Extrakten vorhandenen ADP und dem nachträglich aus ATP gewonnenen ADP. In einer dritten Probe des Trichloressigsäureextraktes wurde ATP + ADP zu Adenylsäure (AMP) hydrolysiert und die spezifische Aktivität des α-Phosphors ebenfalls nach papierchromatographischer Trennung festgestellt. Aus diesen Daten läßt sich dann die spezifische Aktivität jedes einzelnen Phosphors von ATP berechnen. Die so gewonnenen Werte sind allerdings nur dann ganz genau,

wenn die ursprünglich in den Extrakten vorhandenen ATP- und ADP-Fraktionen hinsichtlich der spezifischen Aktivität ihres α- und β-Phosphors übereinstimmen. Man kann annehmen, daß dies tatsächlich annähernd zutrifft, denn zwischen der spezifischen Aktivität des natürlichen ADP und der spezifischen Aktivität der Gesamtfraktion (natürliches ADP + nachträglich gewonnenes ADP) waren bei einer Anzahl von Kontrollversuchen keine ins Gewicht fallende Unterschiede festzustellen.

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von AMP diente der Bariumniederschlag von 1 ml Muskelextrakt, der bei der Kreatinphosphat-Bestimmung anfiel. Dieser Niederschlag wurde nach Aufschwemmung in destilliertem Wasser mit Ammoniak auf p_H 8,2 eingestellt und 7 min im siedenden Wasserbad hydrolysiert. Nach nochmaliger Bariumfällung wurde abzentrifugiert und die überstehende Lösung, die AMP als lösliche Bariumsalz enthält, mit dem 4fachen Volumen Äthanol versetzt. Dadurch wurde Barium-AMP innerhalb 45 min im Eisbad bei p_H 8,2 (Einstellung mit KOH) zum Ausfallen gebracht. Anschließend wurden die Barium-Ionen — nach Abzentrifugierung und Wiederauflösung des Niederschlags in 5%iger Ameisensäure — mittels n-H_2SO_4 entfernt. Zur weiteren papierchromatographischen Reinigung von AMP diente Lösungsmittel III (siehe oben) in aufsteigender Anordnung bei Zimmertemperatur (Laufzeit 18 Std). Zur Entfernung der letzten Spuren von anorganischem ^{32}P wurden an die Startlinie 5 μl der unter Absatz 2a angegebenen Phosphatlösung aufgetropft.

Ergebnisse

1. Der Einbau von ^{32}P in ATP und Kreatinphosphat bei Anwendung radioaktiver Phosphat-Ringer-Lösungen mit niedrigem Phosphatgehalt [0,4 μmol PO_4/ml = 3,8 mg-% PO_4]

Der Einbau von radioaktivem Phosphat in die verschiedenen Fraktionen des ruhenden M. rectus geht nach unseren vorausgegangenen Studien mit sehr charakteristischer Geschwindigkeit vor sich. Am schnellsten tauscht sich in allen Fällen der terminale Phosphor, d. h. der γ-Phosphor von ATP gegen ^{32}P aus, während der Kreatinphosphor und der β-Phosphor von ATP träger reagieren. Nur ganz geringe Umsetzungsgeschwindigkeiten werden an dem stabilen α-Phosphor von ATP gefunden. Setzt man die spezifische Aktivität des terminalen γ-Phosphors von ATP gleich 100, so gelten für den ruhenden M. rectus bei 20° C und 30 min Expositionszeit folgende relative Austauschgeschwindigkeiten (10 Versuche von Fleckenstein, Janke u. Davies [1955]):

$$P^{\alpha}: P^{\beta}: P^{\gamma}: \text{Kreatin-P} = 1{,}9 : 29{,}0 : 100 : 71{,}1$$
$$(\pm\, 0{,}4)\ (\pm\, 3{,}3)\quad (\pm\, 1{,}6)$$

Elektrische Reizung von 30 sec Dauer am Ende der Expositionszeit hatte in diesen Versuchen keinen stärkeren Einfluß auf die Verteilung der Radioaktivität, insbesondere war keine Zunahme der spez. Aktivität des γ-Phosphors von ATP und des Kreatinphosphors im Vergleich zu den ruhenden Muskeln festzustellen. Nur die spezifische Aktivität des β-Phosphors von ATP stieg in den gereizten Muskeln merklich an; der

β-Phosphor von ATP erreichte dabei in 6 gereizten Muskeln eine relative spezifische Aktivität von 52,0 ($\pm$ 6,5).

Nach diesen Erfahrungen konnten auch bei pharmakologischen Dauerkontrakturen keine wesentlichen Steigerungen der ^{32}P-Aufnahme erwartet werden. *Trotzdem brachten schon die ersten Versuche eine Überraschung; denn die Kontrakturstoffe Acetylcholin, Succinylbischolin und*

Abb. 1. UV-Bild des Chromatogramms eines Muskelpaares (M. rectus abdomn. von R. esculenta) nach Anwendung des I. und II. Lösungsmittels. Der dicke UV-absorbierende Fleck ist ATP, der schwächere Fleck darüber ist ADP. Der rechte M. rectus wurde im Zustand der Ruhe in flüssigem Stickstoff eingefroren, der linke M. rectus wurde im kontrahierten Zustand nach 30 min Aufenthalt in einer Acetylcholin-Ringer-Lösung in flüssigen Stickstoff versenkt. Die Chromatogramme wurden als Duplikat angelegt. Auch nach 30 min Kontrakturdauer ist keine deutliche Verschiebung des Verhältnisses ATP/ADP festzustellen

Nicotin setzten die Aufnahme von ^{32}P in die ATP- und Kreatinphosphat-Fraktion zum Teil bedeutend herab. Dagegen blieb der ATP-Gehalt auch während 30 min Kontraktur praktisch konstant (vgl. Abb. 1 u. Tab. 1). In Tab. 1 sind die Endergebnisse aus einigen Experimenten zusammengefaßt: Versuch R_{36} zeigt den hemmenden Einfluß von Acetylcholin (Konz. 1:10000) auf den ^{32}P-Einbau am P^{γ} von ATP und am Kreatin-P. Noch auffälligere Hemmungen der ^{32}P-Aufnahme wurden während der Kontrakturen durch Succinylbischolin (Konz. 1:5000) und Nicotintartrat (Konz. 1:2500) gefunden. In Versuch R_{37} betrug z. B. die spezifische Aktivität des γ-Phosphors von ATP nach 30 min Kontraktur in einer radioaktiven Succinylbischolin-Phosphat-Ringer-Lösung $63 \cdot 10^{-3}\%$ des extracellulären P, während der ruhende Kontrollmuskel in der gleichen

Tabelle 1. *Einbau von ^{32}P in die ATP und Kreatinphosphat-Fraktion isolierter Eskulenten-Recti im Zustand der Ruhe bzw. Kontraktur oder nach intensiver tetanischer Reizung.*

(PO_4-Gehalt der radioaktiven Phosphat-Ringer-Lösungen 0,4 μmol/ml.) Getrennte Bestimmung der spezifischen Aktivitäten des α-, β- und γ-Phosphors von ATP. Spezifische Aktivitäten ausgedrückt in cts/min/μg P und in Prozent der Aktivität des extracellulären P

Versuchs-Nr.	Expositionszeit-Temp.		ATP	Spezifische Aktivität des ATP-Phosphors						Spezifische Aktivität des Kreatinphosphors		Spezifische Aktivität des extracell. P cts/min/μg 100%	
				P^{α}		P^{β}		P^{γ}					
			μmol/g	cts/min/μg	% $\times 10^{3}$	cts/min/μg	% $\times 10^{3}$	cts/min/μg	% $\times 10^{-3}$	cts/min/μg	% $\times 10^{-3}$		
R_{36}	30 min	Arbeitsmuskel	2,03	17	8	87	41	250	118	140	66	211500	Acetylcholin 1 : 10000
	20° C	Ruhemuskel	2,07	14	6	104	48	386	177	254	116	218000	—
R_{37}	30 min	Arbeitsmuskel	1,54	8	3	60	26	145	63	92	40	230500	Succinylbischolin 1 : 5000
	20° C	Ruhemuskel	1,64	8	3	122	50	488	198	372	151	246500	—
R_{39}	30 min	Arbeitsmuskel	2,28	4	2	40	23	124	70	86	48	177400	Succinylbischolin 1 : 5000
	20° C	Ruhemuskel	2,43	14	8	42	24	250	143	192	110	174500	Succinylbischolin 1 : 5000 + Curare 1 : 10000
R_{40}	30 min	Arbeitsmuskel	2,13	3	1	55	21	176	68	92	36	258000	Nicotin-Tartrat 1 : 2500
	20° C	Ruhemuskel	2,00	15	6	105	41	351	136	258	100	259000	–

Tabelle 1 (Fortsetzung)

R_{42}	15 min 20° C	Arbeitsmuskel	2,04	7	5	27	19	104	72	84	58	1 min Tetanus vor $^{32}PO_4$-Anwendung
		Ruhemuskel	1,99	10	7	28	19	247	171	198	137	—
											144500	
R_{44}*	15 min 20° C	Arbeitsmuskel	1,94	1	17	21	347	59	975	30	496	1 min Tetanus vor $^{32}PO_4$-Anwendung
		Ruhemuskel	2,06	1	16	17	271	63	1005	37	590	—
											6050	
											6270	

* In Versuch R_{44} betrug der extracelluläre PO_4-Gehalt nicht 0,4 μmol/ml sondern 16 μmol/ml.

Zeit etwa dreimal soviel ^{32}P am terminalen P von ATP einbaute (spez. Aktivität $198 \cdot 10^{-3}$% des extracellulären P). Gleichzeitig sank während der Kontraktur die Aufnahme von ^{32}P in die Kreatinphosphat-Fraktion auf beinahe $^1/_4$ der Norm ab. Annähernd identische Resultate wurden in Versuch R_{40} bei Verwendung von Nicotintartrat als Kontrakturstoff erhalten. In Abb. 2 sind die relativen Geschwindigkeiten des ^{32}P-Einbaus für die einzelnen Fraktionen nach Versuch R_{37} aufgetragen (Austauschgeschwindigkeit des γ-Phosphors von ATP im ruhenden M. rectus = 100). Man kann hieraus ohne Schwierigkeit ersehen, daß sich die Hemmung des ^{32}P-Einbaues an den verschiedenen P-Fraktionen der Kontrakturmuskeln in ähnlicher Weise auswirkt. Trotzdem ergeben sich bei näherer Betrachtung der Experimente R_{36}, R_{37}, R_{39} und R_{40} gewisse Besonderheiten; denn das prozentuale Ausmaß dieser Hemmung scheint jeweils in der Reihenfolge Kreatin-P > P^γ von ATP > P^β von ATP etwas abzunehmen (vgl. Tab. 2).

Die spezifische Aktivität des β-Phosphors bleibt also in den Kontrakturmuskeln im Vergleich zum γ-Phosphor relativ hoch; dies führt zu einer Abnahme des Quotienten (spez. Aktivität P^γ/spez. Aktivität P^β). Auch in unseren früheren Experimenten an elektrisch gereizten Muskeln (30 sec Tetanus bei 20° C) wurde eine mittlere Abnahme dieses Quotienten von 3,2 im ruhenden M. rectus auf 2,0 im gereizten M. rectus gefunden. Eine derartige Verschiebung dürfte für Muskeln im Zustand starker Stoffwechseltätigkeit charakteristisch sein.

Von besonderem Interesse war die *Prüfung kontrakturverhütender*

Tabelle 2. *Prozentuale Hemmung des ^{32}P-Einbaus am β- und γ-Phosphor von ATP sowie am Kreatinphosphor bei pharmakologischen Muskelkontrakturen. Beeinflussung des Quotienten* $\frac{\text{spez. Aktivität des } P^{\gamma}}{\text{spez. Aktivität des } P^{\beta}}$

Experiment Nr.	Hemmung % am P^{β}	Hemmung % am P^{γ}	Hemmung % am Kreatin-P	Spez. Aktivität P^{γ}/P^{β} Ruhemuskel	Spez. Aktivität P^{γ}/P^{β} Kontraktur-muskel	Kontakturstoff
R_{36}	15	33	43	3,7	2,9	Acetylcholin 1:10000
R_{37}	48	68	74	4,0	2,4	Succinylbischolin 1:5000
R_{39}	4	51	56	6,0	3,0	Succinylbischolin 1:5000
R_{40}	49	50	64	3,3	3,2	Nicotin-Tartrat 1:2500

Substanzen. Dabei wurden paarige M. recti für 30 min einer ^{32}P-haltigen Succinylbischolin-Phosphat-Ringer-Lösung ausgesetzt, wobei sich jedoch nur der eine Muskel verkürzte, während der andere Muskel infolge Beimischung von d-Tubocurarin erschlafft blieb. Das Ergebnis (vgl. Versuch R_{39} in Tab. 1) war eindeutig: *d-Tubocurarin hob nicht nur die Kontraktur auf, sondern beseitigte auch den hemmenden Einfluß von Succinylbischolin auf die ^{32}P-Aufnahme.* Ganz ähnlich wirkte sich im Falle von Nicotin der Zusatz des kontrakturverhütenden Tutocains aus: In Versuch R_{41} aus Tab. 3 wurde z. B. — infolge Beimischung von Tutocain zu einer Nicotinlösung — die ^{32}P-Aufnahme in die Kreatinphosphat-Fraktion ums 6fache gesteigert und damit wieder an die Norm angeglichen. *Die ^{32}P-Aufnahme in die ATP- und Kreatinphosphat-Fraktion zeigt also offenbar im Zustand der Erschlaffung ein Optimum, dabei ist es gleichgültig, ob dieser Ruhezustand durch einfachen Aufenthalt der Muskeln in Ringer-Lösung verursacht ist oder ob der Ruhezustand — durch Zusatz kontrakturverhütender Pharmaka zu einer kontrakturstoffhaltigen Ringer-Lösung — künstlich erzwungen wird.*

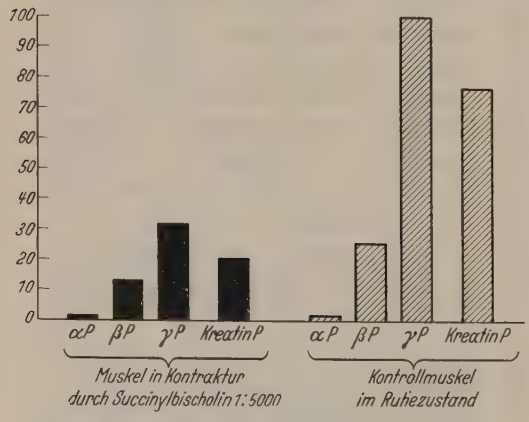


Abb. 2. Relative Geschwindigkeiten des Einbaus von ^{32}P in die ATP- und Kreatinphosphat-Fraktion des M. rectus abdominis im Zustand der Ruhe bzw. Kontraktur durch Succinylbischolin (spez. Aktivität des γ-Phosphors von ATP im ruhenden M. rectus = 100)

2. Die Abgabe von markiertem Phosphat im Zustand der Ruhe und während einer Kontraktur

Die Hemmung der ^{32}P-Aufnahme durch Acetylcholin, Succinylbischolin und Nicotin ließ zunächst die Frage aufkommen, ob vielleicht die Phosphat-Permeabilität der Membran bzw. der Phosphataustausch mit den organischen P-Fraktionen durch Kontrakturstoffe herabgesetzt wird. In einem solchen Falle wäre nicht nur eine Reduktion der ^{32}P-Aufnahme, sondern auch eine Hemmung der ^{32}P-Abgabe durch die genannten Kontrakturstoffe zu erwarten. Zur Prüfung dieser Möglichkeit wurden

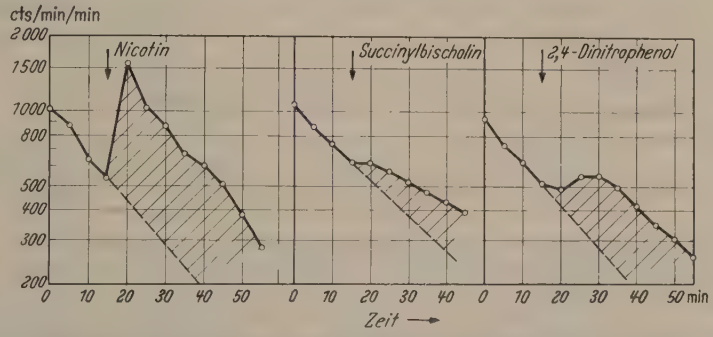


Abb. 3. Austritt von markiertem Phosphat aus dem M. rectus von Eskulenten nach vorausgegangener 1stündiger Exposition in radioaktiven Phosphat-Ringer-Lösungen bei 20° C. Spülung der Muskeln in gewöhnlicher Phosphat-Ringer-Lösung mit anschließendem Zusatz von Nicotintartrat (1 : 2500), Succinylbischolin (1 : 5000) und 2,4-Dinitrophenol (1 : 10000). Messung des austretenden radioaktiven Phosphats in Abständen von jeweils 5 min. Die in die Spülflüssigkeit abgegebene Radioaktivität ist jeweils in cts/min/min ausgedrückt

isolierte M. recti für 1 Std bei 20° C in radioaktive Phosphat-Ringer-Lösung eingelegt und so in die Lage versetzt, ^{32}P-markiertes Orthophosphat aufzunehmen bzw. in die organischen Fraktionen einzubauen. Anschließend wurden die Muskeln nach gründlicher Waschung (3 min Dauer) mit gewöhnlicher Phosphat-Ringer-Lösung (15 ml) für je 5 min gespült und der Austritt von ^{32}P in die Spülflüssigkeiten in einem Flüssigkeitszählrohr gemessen. Die ersten 3 × 15 ml wurden verworfen; der Badwechsel erfolgte in wenigen Sekunden. Ein kräftiger O_2-Strom sorgte für dauernde Bewegung der Spüllösungen.

In Abb. 3 sind 3 derartige Versuche als Beispiele wiedergegeben. Es ist hieraus ohne Schwierigkeit zu ersehen, daß die ^{32}P-Abgabe ruhender Muskeln nach einer Exponentialfunktion abfällt; dementsprechend präsentieren sich die erhaltenen Kurven bei semilogarithmischer Darstellung in Abhängigkeit von der Zeit (während einer Spülperiode von 60—90 min) als Geraden. Nicotin und Succinylbischolin können nun tatsächlich bei Zusatz zur Spülflüssigkeit diesen normalen Kurvenverlauf unter Umständen erheblich verändern. Dabei wurde jedoch niemals eine Verminderung, sondern regelmäßig — erkennbar an der absoluten oder

Tabelle 3. *Einbau von ^{32}P in die Kreatinphosphat-Fraktion isolierter Eskulenten-Recti im Zustand der Ruhe bzw. Kontraktur oder nach intensiver tetanischer Reizung.* (PO_4-Gehalt der radioaktiven Phosphat-Ringer-Lösungen 0,4 µmol/ml) spezifische Aktivitäten ausgedrückt in cts/min/µg P in Prozent der Aktivität des extracellulären PO_4

Versuchs-Nr.	Expositionszeit Temp.		Kreatinphosphat µmol/g	Spezifische Aktivität des Kreatinphosphors cts/min/µg	Spezifische Aktivität des Kreatinphosphors % × 10^{-3}	Spezifische Aktivität des extracell. P cts/min/µg = 100%	
R_{36}	30 min	Arbeitsmuskel	12,22	140	66	211500	Acetylcholin 1 : 10000
	20° C	Ruhemuskel	13,82	254	116	218000	—
R_{37}	30 min	Arbeitsmuskel	11,53	92	41	230500	Succinylbischolin 1 : 5000
	20° C	Ruhemuskel	13,22	372	165	246500	—
R_{38}	30 min	Arbeitsmuskel	10,48	85	45	189000	Succinylbischolin 1 : 5000
	20° C	Ruhemuskel	16,25	323	145	222500	—
R_{39}	30 min	Arbeitsmuskel	10,72	86	49	177400	Succinylbischolin 1 : 5000
	20° C	Ruhemuskel	17,55	192	110	174500	Succinylbischolin 1 : 5000 + d-Tubocurarin 1 : 10000
R_{40}	30 min	Arbeitsmuskel	15,49	92	36	258000	Nicotin-Tartrat 1 : 2500
	20° C	Ruhemuskel	16,26	258	104	259000	—
R_{41}	30 min	Arbeitsmuskel	12,93	62	26	236000	Nicotin-Tartrat 1 : 2500
	20° C	Ruhemuskel	15,91	338	157	215000	Nicotin-Tartrat 1 : 2500 + Tutocain 1 : 2000

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Versuchs-Mr.	Expositions-Zeit, Temp.		Kreatinphosphat µmol/g	Spezifische Aktivität des Kreatinphosphors cts/min/µg	Spezifische Aktivität des Kreatinphosphors % × 10^{-3}	Spezifische Aktivität des extracell. P cts/min/µg = 100%	
R_{42}	15 min	Arbeitsmuskel	13,11*	84	58	144500	1 min Tetanus vor $^{32}PO_4$-Anwendung
	20° C	Ruhemuskel	14,42	198	137		—
R_{43}	20 min	Arbeitsmuskel	14,62*	114	104	109400	1 min Tetanus vor $^{32}PO_4$-Anwendung
	20° C	Ruhemuskel	16,42	197	180		—

* Nach 1 min Tetanus (Frequenz 12/sec) liegt der Kreatinphosphat-Gehalt gewöhnlich um 8—10 µmol/g Muskel tiefer als in ruhenden Muskeln; innerhalb der folgenden 15 bzw. 20 min tritt dann eine weitgehende Regeneration des Kreatinphosphat-Bestandes auf die mit Sternchen (*) bezeichneten Werte ein.

relativen Zunahme der abgegebenen Radioaktivität — eine Steigerung der ^{32}P-Austritte aus den sich kontrahierenden Muskeln beobachtet. *Im Zustand pharmakologischer Kontrakturen ist also die Aufnahme von markiertem Phosphat aus dem Extracellulärraum reduziert und die Abgabe in den Extracellulärraum erhöht.* Während sich im Ruhezustand Phosphat-Aufnahme und -Abgabe offenbar die Waage halten, haben Dauerverkürzungen einen eindeutigen Ausstrom von Phosphat in den Extracellulärraum zur Folge.

Es ist sehr naheliegend dieses Phänomen mit der — für pharmakologische Kontrakturen charakteristischen — Spaltung von Kreatinphosphat in Zusammenhang zu bringen; denn der hieraus resultierende Anstieg des intracellulären Phosphatspiegels müßte die Diffusion von markiertem Phosphat in den Extracellulärraum begünstigen. Diese Kreatinphosphat-Abnahme während pharmakologischer Kontrakturen ist nicht unbedeutend. In unseren früheren Versuchen war z. B. nach 60 sec Einwirkung von Nicotin und Succinylbischolin in den angegebenen Konzentrationen ein mittlerer Kreatinphosphat-Schwund von über 4 µmol/g Muskel zu finden [vgl. Fleckenstein, Janke, Kruse u. Lechner (1955)]. Auch nach einer Kontrakturdauer von 30 min ist meist noch eine beträchtliche Senkung des Kreatinphosphat-Gehalts nachweisbar (vgl. Tab. 3). Während der gesamten Expositionszeit von 30 min dürfte also in den Kontrakturmuskeln eine Tendenz zur Abgabe von

anorganischem Phosphat bestehen; dagegen muß die Aufnahme von ^{32}P-markiertem, anorganischem Phosphat aus dem Extracellulärraum in solchen Muskeln gegen einen erhöhten Gradienten und gegen einen gesteigerten Auswärtsstrom von anorganischem Phosphat erfolgen. *Tatsächlich scheint jeder stärkere Anstieg des anorganischen Phosphats in den Muskelfasern die ^{32}P-Aufnahme aus dem Extracellulärraum zu senken und die ^{32}P-Abgabe zu steigern.* Versuch R_{42} und R_{43} aus Tab. 1 bzw. 3 zeigt z. B., daß der Einbau von ^{32}P auch dann erheblich reduziert ist, wenn man schon *vor* der Applikation der radioaktiven Phosphat-Ringer-Lösung eine beträchtliche Menge Kreatinphosphat durch elektrische Dauerreizung zum Zerfall bringt. Andererseits kann auch 2,4-Dinitrophenol, welches die Kreatinphosphat-Werte ohne Kontraktur tief absinken läßt [vgl. Fleckenstein (1955)], eine Steigerung der ^{32}P-Freisetzung — ähnlich wie Nicotin und Succinylbischolin — bewirken (vgl. Abb. 3). *Man darf aus diesen Beobachtungen folgern, daß die Bewegungen von anorganischem Phosphat zwischen dem Zellinnern und dem Extracellulärraum wahrscheinlich in beiden Richtungen von der Höhe des Phosphatgradienten stark beeinflußt werden.*

3. Der Einbau von ^{32}P in ATP und Kreatinphosphat bei Anwendung radioaktiver Phosphat-Ringer-Lösung mit hohem Phosphatgehalt (8 bzw. 16 µmol PO_4/ml)

Es erschien nach den vorausgegangenen Beobachtungen wünschenswert, den Einfluß des Phosphatgradienten auf die ^{32}P-Aufnahme auch in Phosphat-Ringer-Lösungen mit erhöhtem PO_4-Gehalt zu prüfen.

Die Hauptfraktion (anorg. P + Kreatin-P) macht im M. rectus von Esculenten rund 20 µmol/g Muskel aus; davon liegen im ruhenden Muskel etwa $^1/_3$ ($\approx$ 7 µmol/g) als anorg. P und $^2/_3$ ($\approx$ 14 µmol/g) als Kreatin-P vor. Durch Steigerung des PO_4-Gehaltes der bisher verwendeten Phosphat-Ringer-Lösungen (0,4 µmol PO_4/ml) aufs 20fache, d. h. 8 µmol PO_4/ml müßten also bei ruhenden Muskeln die Konzentrationsunterschiede zwischen dem extra- und intracellulären PO_4 praktisch beseitigt werden. Während einer pharmakologischen Kontraktur z. B. durch Succinylbischolin kann jedoch infolge des Kreatinphosphat-Zerfalls mit einer Zunahme der intracellulären PO_4-Werte bis auf etwa 12 µmol/g Muskel gerechnet werden. Um auch diese Steigerung sicher auszugleichen, wurde der PO_4-Gehalt der Phosphat-Ringer-Lösung in einigen Versuchen bis auf 16 µmol PO_4/ml erhöht.

Der M. rectus zeigt in Phosphat-Ringer-Lösungen mit 8 bzw. 16 µmol PO_4/ml eine unverändert gute Erregbarkeit und Kontraktilität. Die Aufnahme von radioaktivem Phosphat in die organischen P-Verbindungen ist in solchen Lösungen regelmäßig beschleunigt: Die Kreatinphosphat-Fraktion der ruhenden M. recti erreichte z. B. bei einem niedrigen Phosphatgehalt der Ringer-Lösung (0,4 µmol PO_4/ml) während 30 min bei 20° C im Mittel $133 \cdot 10^{-3}$% der spezifischen Aktivität des extracellulären PO_4 (vgl. Versuch R_{36}—R_{41} in Tab. 3); dagegen wurde in Phosphat-Ringer-Lösungen mit hohem Phosphatgehalt (vgl. Versuch

Tabelle 4. *Einbau von* ^{32}P *in die Kreatinphosphat-Fraktion isolierter Eskulenten-Recti im Zustand der Ruhe bzw. Kontraktur oder nach intensiver tetanischer Reizung.* (PO_4-Gehalt der radioaktiven Phosphat-Ringer-Lösungen 8 bzw. 16 μmol PO_4/ml) spezifische Aktivitäten ausgedrückt in cts/min/μg P und in Prozent der Aktivität des extracellulären PO_4

Versuchs-Nr.	Expositionszeit Temp.		Kreatinphosphat μmol/g	Spezifische Aktivität des Kreatinphosphors cts/min/μg	Spezifische Aktivität des Kreatinphosphors % ×10⁻³	Spezifische Aktivität des extracell. P cts/min/μg = 100%	
R_{46}*	30 min	Arbeitsmuskel	13,35	113	1500	7545	Succinylbischolin 1 : 5000
	20° C	Ruhemuskel	13,24	79	960	8210	—
R_{47}*	30 min	Arbeitsmuskel	12,72	34	450	7510	Succinylbischolin 1 : 5000
	20° C	Ruhemuskel	13,10	62	813	7615	—
R_{51}	30 min	Arbeitsmuskel	12,60	243	494	49200	Succinylbischolin 1 : 5000
	20° C	Ruhemuskel	13,14	333	592	56200	—
R_{52}	30 min	Arbeitsmuskel	12,49	227	426	53300	Succinylbischolin 1 : 5000
	20° C	Ruhemuskel	13,05	227	429	52800	—
R_{53}	30 min	Arbeitsmuskel	11,24	233	448	51900	Succinylbischolin 1 : 5000
	20° C	Ruhemuskel	14,22	354	734	48200	—
R_{44}*	15 min	Arbeitsmuskel	12,82	30	496	6050	1 min Tetanus vor $^{32}PO_4$-Anwendung
	20° C	Ruhemuskel	16,31	37	590	6270	

* In den mit Sternchen (*) bezeichneten Versuchen betrug der extracelluläre PO_4-Gehalt 16 μmol/ml, in den übrigen Versuchen 8 μmol/ml.

R_{46}—R_{53} in Tab. 4) unter sonst gleichen Bedingungen eine mittlere spezifische Aktivität des Kreatin-P von $706 \cdot 10^{-3}$% gemessen. Dieser Wert ist also etwa 5 mal höher als in gewöhnlicher Phosphat-Ringer-Lösung mit 0,4 µmol PO_4/ml. *Noch auffälliger ist jedoch, daß in Phosphat-Ringer-Lösungen mit hohem Phosphatgehalt keine sehr großen Unterschiede zwischen der ^{32}P-Aufnahme ruhender und dauerkontrahierter M. recti nachweisbar sind* (vgl. Versuch R_{46}—R_{53} aus Tab. 4). Multipliziert man jeweils die in 1 g Muskel enthaltene Kreatinphosphat-Menge (µg) mit der spezifischen Aktivität des Kreatin-P (cts/min/µg) so erhält man die Gesamtaktivität (und damit die Menge an markiertem extracellulärem Phosphat), die während der Expositionszeit in die Kreatinphosphat-Fraktion eingebaut wurde. In Tab. 5 sind die so berechneten Mengen an

Tabelle 5. *Einbau von extracellulärem Phosphat in die Kreatinphosphat-Fraktion ruhender und dauerkontrahierter Esculenten-Recti bei 20° C und 30 min Expositionszeit in $^{32}PO_4$-Ringerlösung mit verschiedenem PO_4-Gehalt.*

(Kontraktur durch Succinylbischolin 1 : 5000)

PO_4-Gehalt der extracellulären Lösung µmol P/ml	Eingebaute Menge an anorganischem P µg P/min/g Muskel		Mittelwerte aus Versuch Nr.
	Ruhemuskel	Kontrakturmuskel (Succinylbischolin 1 : 5000)	
0,4	0,022	0,005	R_{37}, R_{38}, R_{39}
8,0	0,082	0,057	R_{51}, R_{52}, R_{53}
16,0	0,121	0,136	R_{46}, R_{47}

extracellulären anorganischem P zusammengestellt, welche von 1 g Muskel — im Ruhestand sowie während einer Succinylbischolin-Kontraktur — pro Minute bei 20° C in Form von Kreatinphosphat organisch gebunden wurden. Diese Werte zeigen ebenfalls, daß die Phosphataufnahme bei Erhöhung der extracellulären Phosphatkonzentration ansteigt, wobei sich die Intensität der Phosphat-Aufnahme in den Kontrakturmuskeln an die der Ruhemuskeln angleicht. Auch die oben besprochene Hemmung der ^{32}P-Aufnahme, die nach erschöpfender tetanischer Reizung — offenbar als Folge des Kreatinphosphat-Zerfalls — bei niedrigem Phosphatgehalt der extracellulären Lösung zu beobachten war (vgl. Versuch R_{42} und R_{43} aus Tab. 1 und 3), konnte in einer Phosphat-Ringer-Lösung mit 16 µmol PO_4/ml nicht mehr gesehen werden (vgl. Versuch R_{44} aus Tab. 1 und 4). *Auch dieser Befund spricht dafür, daß die Hemmung der ^{32}P-Aufnahme bei Kontrakturen in phosphatarmem Milieu wahrscheinlich als Folge des Ausstroms von Phosphat aus dem Faserinnern angesehen werden kann.* Bei Erhöhung des extracellulären Phosphatgehalts auf die intracellulären Werte fällt dieser Ausstrom — und daher auch die Hemmung der ^{32}P-Aufnahme — weg.

Besprechung

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen zunächst, daß es durch die kombinierte Anwendung von Papierchromatographie und Radiophosphor möglich ist, gute Einblicke in den intermediären Stoffwechsel der energiereichen Phosphate (ATP, Kreatinphosphat) in intakten Muskelfasern zu gewinnen. Von besonderem Interesse ist dabei die getrennte Bestimmung der relativen Umsetzungsgeschwindigkeiten des α-, β- und γ-Phosphors von ATP und von Kreatinphosphat. Solche Untersuchungen begegneten bis vor kurzem beträchtlichen Schwierigkeiten. In der Literatur liegen daher nur wenige Arbeiten vor, in denen ohne Anwendung der Papierchromatographie eine Analyse dieser Umsetzungsgeschwindigkeiten durchgeführt wurde.

Hevesy u. Rebbe (1938), Korzybski u. Parnas (1938) sowie Sacks u. Altshuler (1942) beschränkten sich z. B. auf die Feststellung, daß die ^{32}P-Aufnahme in die beiden säurelöslichen Phosphatgruppen von ATP rasch erfolgt, während die stabile P-Gruppe von ATP nur langsam radioaktiv wird. Eine Bestimmung des Phosphataustauschs am terminalen γ-Phosphor von ATP wurde von Furchgott u. Shorr (1943) in 3 Versuchen an Herzmuskelschnitten vom Hund vorgenommen; dabei wurde jedoch die Aktivität des β-Phosphors von ATP nicht erfaßt. Erst Flock u. Bollman (1944), Cobey u. Handler (1953) sowie Ennor u. Rosenberg (1954) ermittelten nähere Daten über den ^{32}P-Einbau am α-, β- und γ-Phosphor von ATP in der Muskulatur von Ratten, Katzen bzw. Kaninchen (Injektion von radioaktivem Phosphat in vivo). Mit Froschmuskulatur beschäftigten sich Kalckar, Dehlinger u. Mehler (1944); die von diesen Autoren mitgeteilten Werte sind jedoch unter abnormen Versuchsbedingungen gewonnen; für den P^{γ} von ATP wurde daher eine niedrigere Aktivität als für den P^{β} gefunden [vgl. hierzu auch die Kritik von Ennor u. Rosenberg (1954)].

Die papierchromatographische Methodik bietet gegenüber den älteren Verfahren wesentliche Vorteile: Bei papierchromatographischer Trennung können völlig gereinigte P-Verbindungen erhalten werden; infolgedessen sind die spezifischen Aktivitäten der einzelnen P-Fraktionen auf diesem Wege besonders zuverlässig zu bestimmen. Außerdem werden für eine komplette Analyse des Phosphataustauschs an den wichtigsten P-Fraktionen nicht mehr als 100—200 mg Muskelgewebe benötigt. Erst dadurch ist die Möglichkeit gegeben, den Einbau von radioaktivem Phosphat unter den verschiedensten Bedingungen bequem an einzelnen isolierten Froschmuskeln zu verfolgen. Bei den oben erwähnten Untersuchungen anderer Autoren kam meist eine etwa 100 mal größere Menge Muskulatur zur Aufarbeitung.

Überblickt man unsere auf papierchromatographischer Basis am M. rectus gewonnenen Resultate, so scheinen für die Geschwindigkeit des Einbaues von extracellulärem, ^{32}P-markiertem Orthophosphat in die energiereichen P-Verbindungen vor allem 2 Faktoren maßgebend zu sein:

a) Die Geschwindigkeit der Phosphorylierungen, durch die der anorganische ^{32}P in organische Bindung übergeführt wird. Bei Kühlung der

Muskeln auf 0° C erfolgt daher die ^{32}P-Aufnahme in die organischen P-Fraktionen etwa 10—20 mal langsamer als bei 20° C [vgl. Fleckenstein, Janke u. Davies (1954); Fleckenstein (1955, 1956)]. 2,4-Dinitrophenol, Monojodessigsäure und Cyanid können die ^{32}P-Aufnahme durch Hemmung der Phosphorylierungen auf verschiedenen Wegen ebenfalls rasch reduzieren.

b) Die Höhe des Phosphatgradienten, über den die ^{32}P-Aufnahme aus dem Extracellulärraum zu erfolgen hat. Bei einem extracellulären Phosphatgehalt von 0,4 µmol/ml, der den physiologischen Werten etwa entspricht, beträgt das Verhältnis intracelluläres anorg. Phosphat/extracelluläres anorg. Phosphat in ruhenden Muskeln rund 20:1. Wird dieser Gradient bei intensiver Muskeltätigkeit infolge Abspaltung von anorganischem Phosphat aus Kreatinphosphat weiter erhöht, so geht die Aufnahme von ^{32}P aus dem Extracellulärraum zurück. Umgekehrt steigt die ^{32}P-Aufnahme erheblich an, wenn man den extracellulären Phosphatgehalt steigert bzw. an die intracellulären Werte angleicht.

Eine Hemmung des Einbaues von extracellulärem markiertem Phosphat in die energiereichen P-Verbindungen kann also entweder auf direktem Wege, d. h. durch Herabsetzung der Phosphorylierungen, oder auf indirektem Wege, d. h. durch Erhöhung des Phosphatgradienten, verursacht sein. Welche von diesen beiden Möglichkeiten im Einzelfall zutrifft, bedarf jeweils genauer Prüfung. Am besten scheint sich hierfür die Anwendung phosphatreicher Lösungen zu eignen. Echte Phosphorylierungsgifte wie 2,4-Dinitrophenol können z. B. die ^{32}P-Aufnahme in ATP und Kreatinphosphat auch in einem Milieu mit hohem extracellulären Phosphatgehalt noch unverändert stark unterdrücken (unveröffentlichte Beobachtungen). Im Gegensatz dazu können Reduktionen der ^{32}P-Aufnahme, die auf einer Erhöhung des Phosphatgradienten beruhen, durch Steigerung des extracellulären Phosphatgehalts beseitigt werden. Dementsprechend verlieren Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin in einem phosphatreichem Milieu ihren hemmenden Einfluß auf den ^{32}P-Einbau[1].

Es ist leicht einzusehen, daß bei intensiver Muskeltätigkeit in einem phosphatarmen Milieu die beiden für die ^{32}P-Aufnahme wichtigsten Faktoren — Phosphorylierungsgeschwindigkeit und Phosphatgradient — unter Umständen entgegengesetzte Wirkungen ausüben könnten. Einerseits ist infolge der Spaltung von Kreatinphosphat eine Erhöhung des Phosphatgradienten und damit eine *Herabsetzung der ^{32}P-Aufnahme* zu erwarten. Andererseits würde eine eventuelle Intensivierung des

[1] Als weiteres Unterscheidungsmerkmal ergab sich, daß echte Phosphorylierungsgifte besonders starke Hemmungen des ^{32}P-Einbaus in die γ-Position von ATP und in die Kreatinphosphat-Fraktion zur Folge haben, während Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin die ^{32}P-Aufnahme in die verschiedenen P-Fraktionen gleichmäßiger reduzieren.

intermediären Phosphatstoffwechsels zu einer *Steigerung der ^{32}P-Aufnahme* in die organischen Fraktionen führen. Auch hier sind also nur dann klare Verhältnisse zu schaffen, wenn man den Einfluß des Phosphatgradienten durch Anwendung phosphatreicher Lösungen ausschaltet. In der vorliegenden Arbeit wird über eine Serie von Experimenten mit Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin berichtet, bei denen diese Überlegungen bestimmend waren: Die extracellulären Phosphatwerte wurden deshalb völlig an die intracellulären Werte angeglichen. Man müßte erwarten, daß unter diesen Bedingungen die Aufnahme von ^{32}P in ATP und Kreatinphosphat tatsächlich einen Indicator für die Intensität der Phosphorylierungs-Prozesse im Faserinnern darstellt. *Trotzdem ergaben diese Versuche ein anderes Resultat als den konventionellen Vorstellungen entspricht. In keinem Fall bauten dauerkontrahierte M. recti während 30 min Exposition in radioaktiven Phosphat-Ringer-Lösungen mehr markiertes Phosphat in die ATP- und Kreatinphosphat-Fraktion ein, als im Ruhezustand.* In einer anderen Versuchsreihe war auch intermittierende elektrische Reizung ohne Effekt. *Es bleibt also die — schon in unseren früheren Experimenten gefundene — Tatsache bestehen, daß die Geschwindigkeit der ^{32}P-Aufnahme in die energiereichen P-Verbindungen nur durch Steigerung der Temperatur, nicht aber durch Muskeltätigkeit in die Höhe getrieben werden kann.* Lediglich die relative spezifische Aktivität des β-Phosphors von ATP steigt im elektrisch oder pharmakologisch gereizten M. rectus in charakteristischer Weise an.

Summary

Paperchromatography and radiophosphorus have been used to determine the individual turnover rates of the 3 P atoms of ATP and of creatine phosphate (CP) on pairs of frog rectus abdominis. The organic P-compounds in resting muscles exposed to a RINGER solution containing ^{32}P-labeled orthophosphate (0,4 μmol PO_4/ml; 30 μC/ml) take up the radioactivity with a rather different speed. If the terminal P^γ of ATP is taken as 100 the following relative turnover rates were found in 10 experiments at 20° C:

$$P^\alpha : P^\beta : P^\gamma : CP = 1{,}9 (\pm 0{,}4) : 29{,}0 (\pm 3{,}3) : 100 : 71{,}1 (\pm 1{,}6)$$

In all cases CP was found to be less radioactive than the terminal P^γ of ATP.

Permanent shortening was induced by adding acetylcholine, succinylcholine or nicotine to the radioactive medium. Obviously the incorporation of ^{32}P into ATP and CP was not increased during contracture but reduced to about $^1/_3$—$^1/_4$ of the normal, the difference between the specific activities of P^γ and CP being unchanged. The inhibition of the ^{32}P-uptake in contractured muscles seems to be a consequence

of the fission of CP leading to an increased phosphate gradient and to a net phosphate efflux. Therefore acetylcholine, succinylcholine or nicotine did not inhibit the ^{32}P uptake if the extracellular orthophosphate concentration was rised up to the intracellular level. In no case more ^{32}P labeled orthophosphate was incorporated into ATP or CP during contractures as compared with the resting controls.

Literatur

Cobey, F. A., and P. Handler: Apparent adenylate kinase activity in vivo. J. of Biol. Chem. **204**, 283—288 (1953). — Eggleston, L. V., and R. Hems: Separation of adenosine phosphates by paper chromatography and the equilibrium constant of the myokinase system. Biochemic. J. **52**, 156—160 (1952). — Ennor, A. H., and H. Rosenberg: An investigation into the turnover rates of organophosphates. The rate of incorporation of ^{32}P into adenosine triphosphate and phosphocreatine in skeletal muscle. Biochemic. J. **56**, 308—316 (1954). — Fleckenstein, A.: Der Kalium-Natrium-Austausch als Energieprinzip in Muskel und Nerv. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955. — Biochemie der Muskelerregung. Referat 22. Tagung der Dtsch. Pharmakol. Ges. in Graz, September 1955, siehe Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **228**, 46—67 (1956). — Fleckenstein, A., u. J. Janke: Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphor-Verbindungen im kontrahierten und erschlafften Froschmuskel. Pflügers Arch. **258**, 177—199 (1953). — Fleckenstein, A., J. Janke u. R. E. Davies: Phosphate compounds and muscle contraction. Résumés des Communications 3. Congr. Internat. Biochemie, Brüssel, S. 79 (1955). — Fleckenstein, A., J. Janke, R. Kruse u. G. Lechner: Über das Verhalten von Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat und anderen Phosphorsäure-Estern bei der Kontraktur des Froschrectus durch Acetylcholin, Nicotin und Succinylbischolin. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 465—475 (1955). — Flock, E. V., and J. L. Bollmann: Adenosine triphosphate in muscles of rats studied with radioactive phosphorus. J. of Biol. Chem. **152**, 371—383 (1944). — Furchgott, R. F., and E. Shorr: Phosphate exchange in resting cardiac muscle as indicated by radioactivity studies. J. of Biol. Chem. **151**, 65—86 (1943). — Gerlach, E., E. Weber u. H. J. Döring: Einige neue Lösungsmittel für die Papierchromatographie von Phosphorsäure-Estern. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 9—17 (1955). — Hevesy, G., and O. Rebbe: Molecular "rejuvenation" of muscle tissue. Nature (Lond.) **141**, 1097—1098 (1938). — Kalckar, H. M., J. Dehlinger and A. Mehler: Rejuvenation of phosphate in adenine nucleotides. The rate of rejuvenation of labile phosphate compounds in muscle and liver J. of Biol. Chem. **154**, 275—291 (1944). — Korzybski, T., u. J. K. Parnas: Über Abbau und Wiederaufbau der Adenylsäure im Warmblütermuskel. Z. physiol. Chem. **255**, 195—204 (1938). — Sacks, J., and C. H. Altshuler: Radioactive phosphorus studies on striated and cardiac muscle metabolism. Amer. J. Physiol. **137**, 750—760 (1942).

Professor Dr. A. Fleckenstein,
Physiologisches Institut der Universität Freiburg i. B.

Berichtigung zur Diskussion Wolff, Genf, in Arch. exper. Path. **228**, 93 (1956):
Hier muß der erste Satz wie folgt lauten: Vielleicht darf man zu diesem Thema auch die Opiat-Antagonisten vom Allyltyp erwähnen, d. h. die Beziehungen von N-Allyl-normorphin (Nalorphin) und (-)-3-Oxy-N-allyl-morphinan (Levallorphan) zu Morphin bzw. (-)-3-Oxy-N-methyl-morphinan (Laevorphan) . . .